

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

SUR LE RUBIDIUM ET D'AUTRES MÉTAUX ALCALINS CONTENUS DANS LE SANG HUMAIN

par GABRIEL BERTRAND et DIDIER BERTRAND.

Bien que le rubidium ait été découvert en 1860 par Bunsen et Kirchhoff [1] et déjà signalé dans quelques échantillons d'origine végétale par Grandeau en 1863 [2], sa recherche systématique dans le monde des plantes et des animaux n'a été abordée que très récemment. Les caractères analytiques de ce métal alcalin en font un élément difficile à doser, et c'est seulement en 1943, après la mise au point d'une méthode de dosage spectro-photométrique [3] permettant d'évaluer jusqu'à un minimum de 0,0002 mg dans 10 mg d'un mélange de chlorures alcalins, qu'une étude quantitative générale a pu être entreprise.

De ces recherches nous avons pu conclure, dès 1944, à la présence générale du rubidium d'abord chez les végétaux [4], puis l'année suivante chez les animaux [5] ; chez ceux-ci nous trouvions, en particulier, environ 7 mg de rubidium par litre dans le sang du cheval. Chez l'homme, des sondages qualitatifs avaient déjà été effectués par H. Ramage et J. H. Sheldon qui, en 1930, signalaient sa présence dans le sang [6], mais, deux ans après, ne purent le déceler que dans 14 échantillons de sang sur les 23 qu'ils analysèrent [7].

Ayant à notre disposition une méthode non seulement qualitative, mais quantitative, très sensible et très exacte de détermination du rubidium, il nous a paru intéressant d'examiner à nouveau la question restée imprécise de la présence de ce métal dans le sang. On commence, en effet, à s'intéresser au rôle joué par le

potassium dans l'organisme humain. Or, le potassium et le rubidium sont très voisins au point de vue chimique. Dans cette première étude, nous avons cherché si le rubidium existe normalement dans le sang humain et dans quelles proportions.

Rappelons brièvement la technique analytique employée. 10 cm³ de sang retirés par ponction d'une veine superficielle du pli du coude sont versés dans une capsule de platine et desséchés à l'étuve. La minéralisation en deux temps du résidu est suivie d'un traitement par l'acide chlorhydrique concentré, puis d'une évaporation à sec au bain-marie. De la solution des cendres acidifiée par l'acide chlorhydrique et filtrée, on sépare les sesquioxides et les alcalino-terreux par précipitation en milieu ammoniacal avec du phosphate d'ammoniac, dont on élimine l'excès, en même temps qu'on transforme les sulfates en chlorures, par le chlorure de plomb. Le plomb est à son tour précipité par l'hydrogène sulfuré et la solution ainsi purifiée est évaporée à sec, puis chauffée, au-dessous du rouge, pour chasser les sels ammoniacaux. On obtient un résidu de chlorures alcalins composés principalement de chlorures de sodium et de potassium que l'on pèse. C'est sur 10 mg de ce mélange que l'on fera le dosage spectrographique.

Le sang veineux sur lequel nous avons opéré a été prélevé le matin, sur des sujets à jeun, jeunes, apparemment en bonne santé, choisis parmi les travailleurs du Laboratoire (1). Les dosages ont été effectués sur 10 personnes du sexe masculin et 9 du sexe féminin.

Dans tous les cas, nous avons rencontré et dosé le rubidium. Les résultats que nous avons trouvés sont groupés dans le tableau ci-après.

D'après ces résultats, la quantité de rubidium rencontrée dans un litre de sang a été, pour un homme, comprise entre 1,63 et 4,95 mg, avec une valeur moyenne de 3,15 mg. Pour la femme, ce taux a été légèrement inférieur : il a varié de 1,12 à 5,55 mg, avec une valeur moyenne de 2,83 mg.

Cette petite différence, analogue à celle connue pour le potassium, peut sans doute être expliquée par une localisation de la plus grande partie du rubidium dans les globules rouges dont le nombre est, comme on sait, plus élevé chez les hommes que chez les femmes. Nous reviendrons prochainement sur cette question.

Quant au sodium et au potassium que nous avons également dosés, leur teneur moyenne par litre est respectivement de 1,84 et 1,75 g pour l'homme, de 2,28 et 1,55 g pour la femme.

La majorité des chiffres relatifs au sodium et au potassium sont

(1) Auxquels nous adressons nos remerciements, en particulier à M^{lle} Fr. Chasseigne pour son aide dans une partie des opérations.

HOMMES numéros	Rb mg	K g	Na g	FEMMES numéros	Rb mg	K g	Na g
2.	1,63	1,75	1,75	3.	2,46	1,15	2,33
4.	3,09	1,20	1,93	6.	3,88	1,73	2,53
5.	4,10	0,92	2,29	10.	2,07	1,51	2,46
7.	3,08	2,34	1,22	12.	2,40	1,23	2,37
8.	2,30	1,95	1,57	16.	5,55	1,71	2,12
9.	3,18	1,89	1,89	17.	3,87	2,48	1,47
11.	4,45	1,29	2,34	18.	3,43	1,63	2,02
13.	3,13	1,86	1,75	19.	1,45	0,79	3,26
14.	4,95	1,40	2,11	20.	1,12	1,22	2,71
15.	4,15	2,40	1,88	29.	2,06	2,03	1,53
25.	1,73	1,64	2,12				
26.	2,12	2,42	1,19				
	37,91	21,16	22,04		28,29	15,48	22,80
Moyennes .	3,15	1,75	1,84	Moyennes	2,83	1,55	2,28
Ecart . . . }	1,63	0,92	1,22	Ecart . . . }	1,12	0,79	1,47
	4,95	2,42	2,34		5,55	2,48	3,26

Nota. — Les chiffres sont rapportés au litre et la précision réelle pour un seul dosage correspond à \pm , 7 p. 100 pour le Rb; \pm , 4,8 p. 100 pour le K; \pm , 3,7 p. 100 pour le Na.

en accord avec ceux généralement donnés par la littérature et établis par voie purement chimique. Par contre, nous avons observé dans quelques cas des variations de teneur notablement plus forte, allant de 1 à 3 environ. Ces écarts ne peuvent être imputés à des erreurs analytiques : en effet, malgré la fidélité de la méthode chimico-spectrographique dont nous nous servons, nous avons répété plusieurs analyses en partant de cendres d'un même sang et, soit par la méthode chimique employée seule, soit par la méthode chimico-spectrographique rappelée plus haut, les nouveaux résultats ont confirmé ceux qui avaient déjà été obtenus.

Nous avons, en outre, opéré sur un sang exceptionnellement riche en potassium (celui du sujet 7) et sur deux particulièrement pauvres (sujets 3 et 5), en partant de prises faites trois semaines après les premières. Le sujet 7 était resté en bon état physique et moral ; les sujets 3 et 5 qui, lors de la première prise de sang présentaient un état psychique dépressif et de l'asthénie, étaient nettement améliorés à ce double point de vue au moment de la seconde prise. La teneur en potassium était pratiquement inchangée avec le sujet 7, mais elle était passée chez 3 de 1,15 mg à 2,03 et chez 5 de 0,92 à 1,64 mg. Signalons enfin que la teneur en potassium du sujet 19 (0,79 g) ne pouvait provenir d'un état anémique, la numération globulaire ayant donné un chiffre normal (4 600 000 G. R., T. H. 90 p. 100).

CONCLUSION.

Il se dégage de ces premières recherches que le rubidium existe normalement, à côté du sodium et du potassium, dans le sang humain. Sa valeur moyenne chez l'homme serait de 3,15 mg, légèrement supérieure à celle trouvée chez la femme, 2,83 mg.

Il est important de noter, pour d'éventuelles utilisations cliniques, que de fortes variations de teneur pouvant aller du simple au triple, tant pour le rubidium que pour le sodium et le potassium, ont été observées dans les échantillons de sang que nous avons analysés.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BUNSEN et KIRCHHOFF. *Pogg. Ann.*, 1860, **410**, 107.
- [2] GRANDEAU. *Ann. Chim. Phys.*, 1862, **67**, 155.
- [3] C. R. Acad. Sci., 1943, **247**, 520.
- [4] G. BERTRAND et D. BERTRAND. *Ces Annales*, 1946, **72**, 416.
- [5] G. BERTRAND et D. BERTRAND. *Ces Annales*, 1946, **72**, 805.
- [6] H. RAMAGE et J. H. SHELDON. *Nature*, 1929, n° 123, 601.
- [7] H. RAMAGE et J. H. SHELDON. *Biochem. J.*, 1931, **25**, 1608.

INACTIVATION PAR LA CHALEUR DU VIRUS POLIOMYÉLITIQUE, SOUCHE LANSING (*)

par PIERRE LÉPINE et ALBERT NANTEL (**).

*(Service des Virus de l'Institut de Microbiologie et d'Hygiène
de l'Université de Montréal, et Institut Pasteur, Paris.)*

Les effets de la chaleur sur l'inactivation du virus polio-myélitique ont, du fait de leur intérêt tant théorique pour l'étude des propriétés du virus que pratique en vue de la stérilisation du lait par la pasteurisation, suscité déjà de nombreuses recherches (Leiner et Wiesner [1], Flexner et Lewis [2], Romer et Joseph [3], Kling et Petterson [4], Abramson [5], Howitt [6], Shaughnessy, Harmon et Gordon [7], Bourdillon [8], Jungeblut et Sanders [9], Lawson et Melnick [10]).

Malgré la multiplicité des essais, cependant, les auteurs aboutissent, en raison des variations des conditions expérimentales et parfois de leur insuffisance, à des conclusions contradictoires puisqu'un chauffage d'une durée de trente minutes à 55° C suffit pour les uns, et ne suffit pas pour les autres, à détruire le virus. Lawson et Melnick, après avoir passé en revue les résultats obtenus avant eux, ont montré l'effet protecteur exercé par le lait sur le virus et le rôle que joue la dilution de ce dernier sur la température d'inactivation; ils constatent que le point thermique de destruction du virus poliomyélitique n'a pas encore été établi de façon satisfaisante: il est néanmoins certain que le virus résiste à des températures plus élevées qu'on ne le pensait tout d'abord, et que même après trente minutes de chauffage à 65° et à 70° C des traces de virus actif peuvent encore être mises en évidence dans le matériel chauffé.

Ces considérations nous ont incités à étudier le phénomène de l'inactivation thermique des virus en général, et du virus poliomyélitique en particulier, avec un appareillage nouveau et une technique plus précise, le but de notre étude étant de

(*) Recherches exécutées avec une subvention des Ministères de la Santé de la Province de Québec et du Gouvernement Fédéral du Canada.

(**) Société Française de Microbiologie, séance du 14 décembre 1950.

mesurer la vitesse de destruction du virus en fonction de la durée et de la température de chauffage.

APPAREIL. — Un tube en argent pur, d'un diamètre intérieur de 6 mm et d'un diamètre extérieur de 11 mm et recourbé en U constitue la chambre thermique où le virus est admis pendant le temps de chauffage. La partie inférieure du tube en U est aplatie de façon à former une fente à parois parallèles distantes de 2,5 mm, le volume de la suspension virulente introduite dans le système étant calculé de façon que toute la suspension soit renfermée dans la région du tube en U présentant cet aplatissement. L'ensemble du dispositif est placé

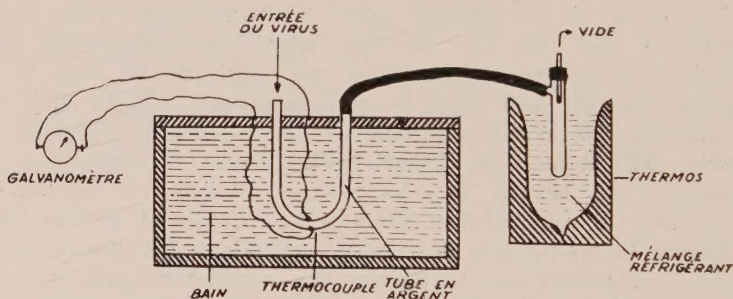


FIG. 1. — Schéma du dispositif expérimental.

dans un bain de très grande capacité à température constante, strictement contrôlée (bain thermostatique Aminco). Un thermocouple branché sur le tube en argent et relié à un galvanomètre permet de lire l'écart de température entre l'intérieur du tube et le milieu ambiant. La suspension virulente est introduite par l'une des branches du tube et lorsque la durée de chauffage voulue est atteinte, un dispositif simple d'aspiration permet la sortie instantanée de l'échantillon chauffé qui est recueilli dans un récipient maintenu à basse température au moyen d'un mélange réfrigérant (fig. 1).

Préparation du virus. — Le virus utilisé a été préparé de la façon suivante : les cerveaux de souris infectés avec le virus Lansing sont broyés dans un mortier et émulsionnés à 10 p. 100 dans l'eau physiologique ; la suspension obtenue est centrifugée pendant quinze minutes à 3 000 t./min., et le liquide surnageant est réparti en volumes égaux dans des fioles d'Erlenmeyer d'une capacité de 50 ml, puis congelé à -40°C .

Méthode. — Au moment de l'emploi, le virus en suspension

à 10 p. 100 est décongelé en plongeant la fiole d'Erlenmeyer dans un récipient rempli d'eau à la température du laboratoire. Dès que le virus est décongelé, il est placé dans un mélange réfrigérant, à 0° C, et maintenu ainsi jusqu'au moment de l'expérience.

On introduit alors 5 ml de virus dans le tube en U au moyen d'une seringue. On ne compte les durées de chauffage qu'au moment où l'équilibre de température est atteint. La mesure des temps est faite au chronomètre.

Après chauffage, le virus est reçu dans un mélange réfrigérant (eau-glace-NaCl), afin de le refroidir dans un temps minimum.

L'échantillon chauffé est ensuite dilué à 1 : 30, 1 : 100, 1 : 300 et 1 : 1 000, puis inoculé par voie intracérébrale à 10 souris par dilution.

Le virus non chauffé est dilué de la même façon et injecté par voie intracérébrale à 10 souris témoins pour chaque dilution.

Les souris ainsi inoculées sont observées pendant une période de trente jours et leur mortalité enregistrée quotidiennement.

RÉSULTATS. — Dans le calcul des résultats, nous avons utilisé la méthode des totaux cumulatifs de Reed et Muench ; pour simplifier, nous ne retenons dans les tableaux suivants que le pourcentage de mortalité observé sur des souris inoculées avec la dilution 1 : 10.

Voici quelques exemples des résultats obtenus :

Chauffage à 60° C.

DURÉE de chauffage	POURCENTAGE de mortalité
0 minute	100
1 minute	87
5 minutes	71
10 minutes	45
15 minutes	37
30 minutes	45

Chauffage à 65° C.

DURÉE de chauffage	POURCENTAGE de mortalité
0 minute	100
1 minute	54
2 minutes	20
5 minutes	27
10 minutes	55
20 minutes	63

Chauffage à 70° C.

DURÉE de chauffage	POURCENTAGE de mortalité
0 seconde	100
30 secondes	60
1 minute	38
2 minutes	36
5 minutes	60
10 minutes	30

Chauffage à 75° C.

DURÉE de chauffage	POURCENTAGE de mortalité
0 seconde	98
15 secondes	61
30 secondes	40
1 minute	36
2 minutes	44
5 minutes	62

Chauffage à 80° C.

DURÉE de chauffage	POURCENTAGE de mortalité
0 seconde	100
15 secondes	73
30 secondes	11
45 secondes	40
1 minute	80
2 minutes	64

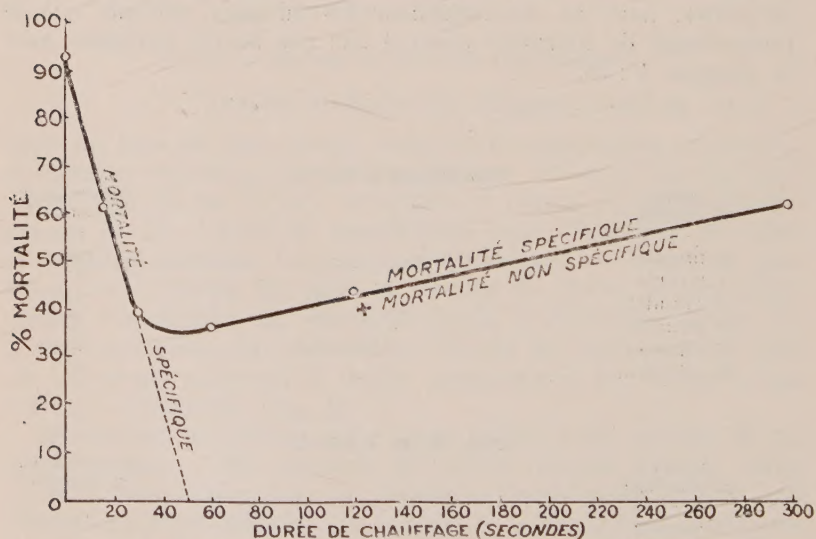


FIG. 2. — Exemple d'une courbe d'atténuation du virus Lansing à la température de 75° : proportion des animaux succombant à l'innoculation en fonction de la durée de chauffage. On remarque pour toutes les durées de chauffage au delà de quarante secondes une mortalité croissante due à la toxicité des protéines dénaturées.

En partant de ces données, on trace des courbes figurant le pourcentage de mortalité en fonction des durées de chauffage, ceci pour chaque température étudiée.

La figure 2 montre l'allure des courbes que l'on obtient (chauffage à 75° C).

DISCUSSION. — L'étude des graphiques obtenus montre dans chaque cas, et pour des durées de chauffage plus ou moins prolongées, selon la température atteinte, une mortalité non spécifique qui vient s'ajouter à la mortalité spécifique et rend toutes lectures impossibles au delà d'une certaine durée de chauffage. Cette mortalité non spécifique est le résultat de l'action toxique exercée par l'injection intracérébrale des protéines du tissu nerveux, dénaturées par le chauffage. Nous avons d'ailleurs remarqué que pour des températures de chauffage supérieures à 80°C, toutes les mesures du pourcentage de mortalité deviennent incohérentes.

Le point d'inflexion de la courbe (fig. 2) correspond au moment où, l'action des protéines dénaturées par chauffage se superposant à l'action du virus, on voit apparaître la mortalité non spécifique dans l'expérience.

Nous sommes ainsi conduits, pour éliminer l'action de cette mortalité non spécifique, à extrapoler jusqu'à l'axe des temps de chauffage les premiers points de la courbe avant l'inflexion de celle-ci. En procédant ainsi, on obtient les résultats suivants, correspondant à une courbe idéale d'inactivation du virus :

TEMPÉRATURE de chauffage	TEMPS D'INACTIVATION du virus
60° C	6,8 minutes.
65° C	2,5 minutes.
70° C	1,5 minute.
75° C	50 secondes.
80° C	31 secondes.

En traçant les résultats précédents sur un papier semi-logarithmique (durée de chauffage sur l'échelle logarithmique et température de chauffage sur l'échelle arithmétique), on obtient une droite (fig. 3) dont la formule générale est représentée par l'équation :

$$y = b \times e^{ax}$$

où y désigne la température de chauffage et x la durée nécessaire du chauffage pour obtenir l'inactivation du virus.

Par calcul, on obtient les valeurs de a et b .

$$a = 0,14.$$

$$b = 3,64 \times 10^4$$

Cette formule permet de calculer la durée de vie moyenne du virus poliomyélitique (souche Lansing) pour une température donnée.

En appliquant arbitrairement cette formule à des températures

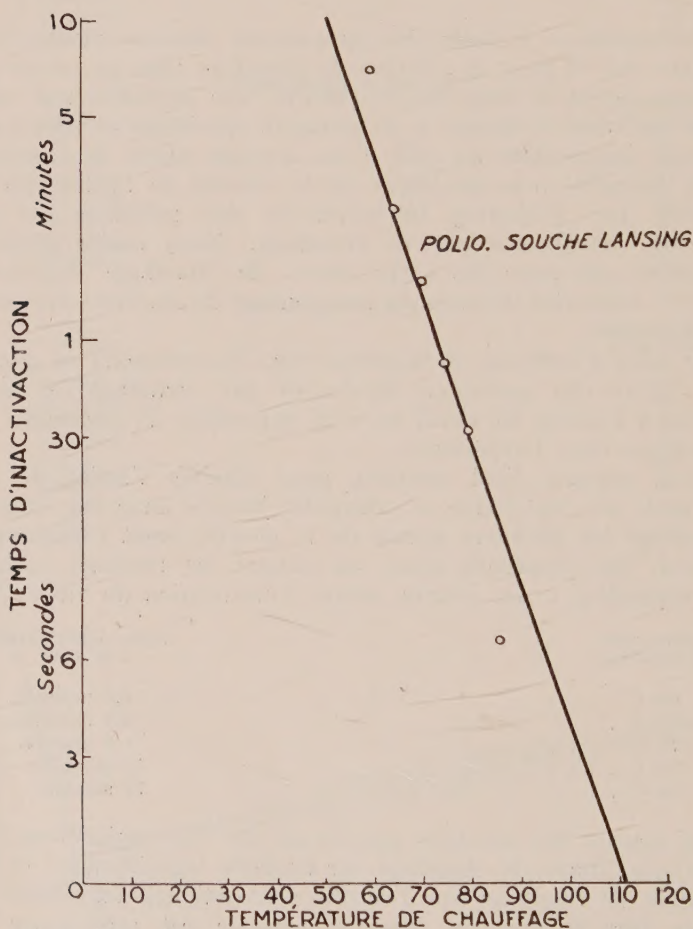


FIG. 3. — Courbe générale du temps d'inactivation du virus poliomyélitique en fonction de la température de chauffage.

plus basses que celles de l'expérience, on peut calculer que dans des conditions théoriques où l'influence de la température serait le seul facteur intervenant dans l'atténuation du virus, l'inactivation du virus poliomyélitique serait obtenue à la température

de 22°C en trois cents jours, et à la température de 0°C en huit ans. Il va de soi que cette façon de procéder est dépourvue de toute rigueur scientifique, mais il est intéressant de noter que ces données purement théoriques sont en bonne concordance avec les observations expérimentales résultant de travaux déjà anciens, en particulier ceux de Kling, Levaditi et Lépine [11], Landsteiner, Levaditi et Pastia [12], Rhoads [13], Flexner et Amoss [14]. Elles n'ont de valeur que pour confirmer indirectement l'extrême résistance du virus dans les milieux extérieurs.

CONCLUSIONS.

Nos expériences ont eu pour but d'établir, grâce à un appareil adapté à cet effet, les temps d'inactivation en fonction de la température du virus poliomyélitique, souche Lansing, en suspension dans l'eau. Les résultats expérimentaux permettent de tracer une courbe et d'en établir l'équation donnant pour toute température la durée nécessaire à l'inactivation du virus, dans des conditions théoriques où interviendrait seul le facteur thermique. Les temps ainsi trouvés sont en accord avec les durées pratiques de survie du virus tirées de l'expérimentation, même pour des températures très éloignées de celles qui ont servi à nos essais.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] C. LEINER et R. VON WIESNER. *Wien. Klin. Wochenschr.*, 1910, **23**, 91.
- [2] S. FLEXNER et P. A. LEWIS. *J. exp. Med.*, 1910, **12**, 227.
- [3] P. H. ROMER et K. JOSEPH. *Münch. Med. Wochenschr.*, 1910, **47**, 2685.
- [4] C. KLING et A. PETTERSON. *Deutsch. Med. Wochenschr.*, 1914, **40**, 320.
- [5] H. L. ABRAMSON. *J. Am. med. Assoc.*, 1918, **70**, 1142.
- [6] B. HOWITT. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1930, **28**, 158.
- [7] H. J. SHAUGHNESSY, P. H. HARMON et F. B. GORDON. *J. Prev. Med.*, 1930, **4**, 149.
- [8] J. BOURDILLON. *Arch. Biochem.*, 1943, **3**, 299.
- [9] C. W. JUNGEBLUT et M. SANDERS. *J. exp. Med.*, 1940, **72**, 407.
- [10] Robert B. LAWSON et J. L. MELNICK. *J. Infect. Dis.*, 1947, **80**, 201.
- [11] C. KLING, C. LEVADITI et P. LÉPINE. *Bull. Acad. Méd.*, 1929, **102**, 158.
- [12] LANDSTEINER, LEVADITI et PASTIA. *Ces Annales*, 1911, **25**, 80.
- [13] RHOADS. *J. exp. Med.*, 1929, **49**, 701.
- [14] FLEXNER et AMOSS. *J. exp. Med.*, 1917, **25**, 539.

LA STREPTOMYCINO-RÉSISTANCE DE SOUCHES DE BACILLES DE KOCH PROVENANT DE LÉSIONS PULMONAIRES DIFFÉRENTES D'UN MÊME MALADE

par G. CANETTI et A. SAENZ.

*(Institut Pasteur, Laboratoires de Recherches sur la Tuberculose
et Service des Voies respiratoires de l'Hôpital Cochin.)*

L'étude de la streptomycino-résistance du bacille de Koch en tuberculose pulmonaire n'a porté jusqu'ici, à de rares exceptions près, que sur les bacilles éliminés par les crachats. Or, l'étude des bacilles isolés des lésions pulmonaires est d'un intérêt plus grand. Elle permet d'établir la relation qui existe entre la fréquence de la résistance et la teneur des lésions en bacilles, ainsi qu'entre la fréquence de la résistance et la structure des lésions. Surtout, elle démontre qu'il peut fort bien y avoir, chez un même malade, coexistence de lésions pulmonaires à bacilles sensibles et de lésions pulmonaires à bacilles résistants, fait déjà établi par Armstrong et Walker [4] pour 1 cas, et par Saenz et Canetti [17] pour 3 cas. Elle apporte ainsi des indications pathogéniques et thérapeutiques d'un certain intérêt.

I. — MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Nous donnons les résultats de 24 cas. Il s'agissait de tuberculoses pulmonaires ayant été soumises à la streptomycinothérapie pendant des délais très variables, allant de vingt-six à deux cent dix jours. Dans 21 cas (*), il y avait eu décès et prélèvement des poumons par autopsie ; dans 3 cas, exérèse chirurgicale d'un poumon. Le nombre de lésionsensemencées fut de 125, soit environ 5 par cas ; vingt et une fois l'ensemencement resta stérile ou se surinfecta. Il y eut donc isolement et titrage des souches provenant de 104 lésions.

(*) Nous remercions vivement MM. Benda, Hamburger, Jacob, Kourilsky et Lacourbe, dont les Services nous étaient ouverts pour la pratique de certaines de ces autopsies.

A. TECHNIQUES. — Une fois les poumons ouverts par une coupe médiane frontale, un fragment des lésions choisies était prélevé à l'aide d'instruments stériles, changés pour chaque lésion. Une partie du prélèvement était utilisée pour l'examen histologique, une autre pour l'examen bactériologique suivant. Un poids de 0,01 g (0,05 g pour quelques lésions présumées paucibacillaires) était broyé dans un mortier, traité par 1 cm³ d'acide sulfurique à 15° pendant vingt minutes et neutralisé par de la soude à 30° en présence de teinture de tournesol, enfin ensemencé en totalité sur 6 tubes de milieu de Löwenstein non streptomyciné ; pour les lésions supposées très riches en bacilles, seul 1/10 de l'émulsion était prélevé, dilué et ensemencé. Le nombre total de colonies était compté au trentième jour. Dans les tableaux, ce nombre est toujours rapporté à 0,01 g de tissu.

De la culture initiale, un nombre élevé de colonies — au moins 50, lorsqu'il en existait autant — étaient prélevées et repiquées après brassage vigoureux sur un même tube de pomme de terre glycinée. De cette culture, 10 cg étaient prélevés vers le quinzième jour à l'aide d'une spatule tarée, mis dans un ballon contenant des billes de verre, fortement agités, puis dilués de telle manière que 1 cm³ de dilution contienne 1 mg de bacilles : la semence de chaque tube, pour l'étude de la streptomycino-résistance, étant de 0,2 cm³ de cette dilution, soit 0,2 mg de bacilles.

L'étude de la résistance était faite en milieu liquide de Youmans, auquel des quantités de 0, 0,5, 1, 2, 5, 10, 50, 100, 500 et 1 000 µg de streptomycine par centimètre cube de milieu avaient été ajoutées. La lecture des tubes était faite aux quinzième et trentième jours. Les résultats qui figurent dans les tableaux sont ceux du quinzième jour. La sensibilité de la souche, ou *titre*, est mesurée par la concentration en streptomycine du premier tube dans lequel il n'y a plus culture. Dans 4 cas (15 souches), l'étude de la résistance fut poussée jusqu'aux concentrations de 1 000, 5 000, 10 000, 20 000 et 50 000 µg par centimètre cube de streptomycine.

D'autre part, pour 81 des 104 lésions, le titrage fut simultanément effectué (avec une semence de 0,2 mg) sur milieu de Löwenstein-Jensen, auquel des concentrations de 3,3, 15, 150 et 1 500 µg par centimètre cube de streptomycine avaient été incorporées, ce qui, compte tenu de la destruction de streptomycine survenant lors de la coagulation du milieu (de 27 à 35 p. 100 d'après les études photofluorométriques de Cummings [7]), représente une concentration finale d'à peu près 2, 10, 100 et 1 000 µg par centimètre cube. La lecture des résultats était faite au trentième jour.

B. COMPARAISON DES RÉSULTATS OBTENUS AVEC LES MILIEUX DE YOUMANS ET DE LÖWENSTEIN AU TRENTIÈME JOUR. — Ces résultats

ont été remarquablement identiques. En considérant comme discordants les seuls ensemencements où il y eut, pour une même concentration de streptomycine, des colonies très nombreuses avec l'un des milieux et une absence totale des colonies avec l'autre, il n'y eut que 3 résultats discordants, contre 78 concordants. Toutefois, dans ces 78 cas, l'abondance de la culture n'était pas toujours la même avec les deux milieux ; il y eut plusieurs fois culture diffuse avec l'un et colonies isolées (moins de 20) avec l'autre ; et aussi, colonies isolées avec l'un et absence totale de colonies avec l'autre. (Nous avons montré ailleurs [4] que les colonies isolées de bacilles de Koch peuvent fort bien se lire en milieu liquide de Youmans.) Dans ces cas, l'avantage resta un peu plus souvent au milieu de Löwenstein. En fait, ces différences sont dues beaucoup plus au hasard de la répartition des variantes résistantes dans les parcelles de semence qu'à des différences de sensibilité du milieu.

C. CHOIX DES CRITÈRES POUR DÉCLARER DIFFÉRENTES DEUX SOUCHES ISOLÉES D'UN MÊME MALADE. — L'un des buts de ce travail étant de voir si les souches initialement identiques de deux lésions pulmonaires d'un même malade peuvent devenir différentes par streptomycinothérapie, il y avait lieu d'examiner à partir de quels écarts de sensibilité deux souches peuvent être considérées comme différentes. Ce problème revient à préciser les écarts de sensibilité pour lesquels une infidélité de la méthode de titrage ne peut être exclue. Pour une gamme de concentrations de streptomycine progressant du simple au double, Youmans et Karlson [20] admettent qu'en milieu de Youmans, les variations observées lors de deux titrages d'une même souche ne dépassent pas un tube. La Commission anglaise [5], pour des concentrations progressant de même, et avec le milieu de Dubos, ont eu des variations de 1 ou 2 tubes, et, dix fois sur cent trente-huit, supérieures.

Nous avons réétudié ce problème, en effectuant à seize reprises le titrage d'une souche déjà isolée et repiquée sur pomme de terre. Huit fois, la comparaison a porté sur des parcelles différentes de la culture sur pomme de terre, et huit fois, sur des prélèvements différents de la dilution déjà prête pour l'ensemencement. La technique du titrage était celle décrite plus haut. La souche, à un premier titrage, avait poussé jusqu'à 10 μ g inclus ; c'est pour de pareilles souches, se trouvant au début de la résistance, que les variations ont les chances d'être les plus grandes. Les résultats ont été groupés dans le tableau ci-après.

La différence maxima a donc été de 5 μ g à 50 μ g, ou 2 tubes, pour la gamme de dilutions utilisée. Afin de nous placer dans des conditions de sécurité plus grandes, nous n'avons dès lors consi-

	DERNIER TUBE POSITIF (au 15 ^e jour)							
	10	10	10	10	5	10	50	10
8 parcelles différentes de culture.	10	10	10	10	5	10	50	10
8 prélèvements différents de la dilution. .	10	5	5	10	10	10	10	10

déré comme sûrement différentes que des souches dont la sensibilité différait de plus de 3 tubes. En fait, la différence était presque toujours bien plus grande, ainsi que le montre le tableau I.

Y avait-il lieu d'essayer de pousser plus avant la différenciation des souches, par exemple en tenant compte des colonies isolées, souvent présentes au trentième jour dans les tubes restés stériles au quinzième ? De pareilles colonies sont très fréquentes, quel que soit le milieu employé ; dans un travail antérieur [4], portant sur 65 titrages en milieu de Youmans, nous les avons trouvées cinquante-cinq fois ; dans le présent travail, pour 53 lésions dont la sensibilité était inférieure à 1 000 μg (c'est-à-dire pour lesquelles tous les tubes n'étaient pas positifs dès le quinzième jour), ces colonies furent notées quarante-six fois. En fait, il s'agit là de variantes résistantes si rares (moins de 4 colonies dans la majorité des cas), comparées au nombre considérable de bacilles présents dans une semence de 0,2 mg, qu'elles sont soumises à des hasards de distribution extrêmes ; ainsi, ces variantes peuvent fort bien exister dans un tube 1 000 μg et manquer dans un tube 100 μg . Il est donc impossible de les faire servir à la différenciation de deux souches.

II. RÉSULTATS.

A. SOUCHES IDENTIQUES ET SOUCHES DIFFÉRENTES CHEZ UN MÊME MALADE. — Les résultats peuvent être divisés en trois groupes.

Dans 8 cas, les titres de toutes les souches provenant d'un même malade furent les mêmes. Il s'agissait, dans la totalité des cas, de souches titrant plus de 1 000 μg . Dans 2 cas, le titrage fut poursuivi jusqu'à 50 000 μg : dans l'un (cas 11), les souches de cinq lésions furent positives à 50 000 μg , celle d'une sixième lésion à 20 000 μg seulement, différence insignifiante. Dans l'autre cas (n° 16), toutes les cinq souches titrées furent positives à 50 000 μg .

Dans 5 cas, les titres des souches provenant d'un même malade montrèrent des différences ne dépassant pas deux tubes. Les écarts observés furent les suivants (voir p. 243) :

TABLEAU I. — Cas ayant permis l'isolement des souches de sensibilité inégale.

NUMÉRO du cas	DURÉE du traitement (en jours)	NATURE DE LA LÉSION	NOMBRE de colonies par 0,01 g de tissu	TITRE (1) de la souche en µg de streptomycine par cm ³
1	60	Paroi de caverne. Caséum solide. Nodule.	> 1 000 712 620	> 1 000 50 500
2	26	Paroi de caverne. Caséum solide. Nodule.	> 1 000 480 63	50 1 1
3	45	Paroi de caverne. Caséum ramolli. Nodule récent. Ganglion.	> 1 000 > 1 000 > 1 000 95	> 1 000 50 > 1 000 > 1 000
10	210	Paroi de caverne. Nodule. Caséum liquide. Ganglion médiastinal.	> 1 000 400 > 1 000 6	< 1 000 (2) 50 > 1 000 (2) 100
13	79	Pièvre fibrineuse. Ganglion médiastinal. Paroi de caverne. Caséum ramolli. Paroi de 2 ^e caverne.	13 42 540 > 1 000 360	50 5 10 10 500
14	94	Paroi de caverne. Nodule. Ganglion hilaire.	55 > 1 000 470	50 > 1 000 (2) > 1 000 (2)
19	40	Nodule très récent. Caséum solide. Ganglion médiastinal.	230 > 1 000 14	10 > 1 000 10
20	112	Pus d'abcès froid thoracique. Paroi de caverne. Nodule.	250 250 3	> 1 000 > 1 000 2
23	134	Paroi de caverne 1. Nodule. Paroi de caverne 2. Paroi de caverne 3.	> 1 000 340 78 600	> 1 000 > 1 000 > 1 000 10
24	55	Paroi de caverne. Granulations confluentes.	3 500	10 > 1 000
27	42	Ganglion médiastinal. Zone de caséum solide. Paroi de caverne. Lésion ganglionnaire crétacée.	3 3 530 1	2 50 > 1 000 10

(1) Le titre de la souche est mesuré par la concentration en streptomycine du premier tube de milieu de Youmans dans lequel il n'y a plus culture.

(2) Souche poussant jusqu'à la concentration de 50 000 µg de streptomycine inclus.

CAS	SOUCHE de titre maximum	SOUCHE de titre minimum
4	100	50
7	100	10
8	500	50
18	50	5
21	100	10

Conformément à ce qui a été dit plus haut, ces souches ne peuvent être considérées comme sûrement différentes.

Enfin, dans 11 cas, les souches provenant de lésions d'un même malade montrèrent des différences de sensibilité considérables. On trouve le détail de ces 11 cas dans le tableau I. Sauf dans 2 cas (2 et 13), la souche ayant le titre maximum est toujours fortement résistante, dépassant 1 000 μ g. La souche ayant le titre minimum est sept fois sensible (≤ 10 μ g ; cas 2, 13, 19, 20, 23, 24, 27) et quatre fois faiblement résistante (50 μ g ; cas 1, 3, 10, 14). Dans 4 cas (1, 10, 13, 27), c'est à 3 ou 4 souches de sensibilité différente que l'on a affaire chez un même malade ; il est vrai que pour les souches intermédiaires, les écarts de sensibilité ne sont pas suffisants pour qu'on puisse les considérer comme sûrement significatifs.

Au total, chez un malade ayant été soumis à la streptomycinothérapie, la coexistence de lésions pulmonaires hébergeant une souche sensible et de lésions pulmonaires hébergeant une souche résistante est parfaitement possible ; et elle ne semble pas rare, encore qu'il soit impossible, on verra plus loin pourquoi, d'établir exactement sa fréquence.

B. SOUCHES IDENTIQUES ET SOUCHES DIFFÉRENTES CHEZ UN MÊME MALADE SELON LA DURÉE ET L'ANCIENNETÉ DU TRAITEMENT. — On sait que la durée du traitement influe de manière essentielle sur la fréquence de la résistance. Influe-t-elle également sur la fréquence de la coexistence de souches de sensibilité différente chez un même malade ?

En groupant ensemble les cas avec souches identiques et les cas avec souches de différence non sûrement significative, on obtient ceci (voir p. 244) :

Il apparaît que les cas avec souches différentes se voient surtout lorsque le traitement a duré moins de quatre-vingts jours (7 cas sur 11), alors que c'est l'inverse pour les cas avec souches identiques (4 cas sur 13). Ce fait peut s'expliquer de deux manières. Il se peut que la résistance apparaisse avec une vitesse inégale selon les lésions : les cas traités pendant des temps plus longs

	DURÉE DU TRAITEMENT			
	Total	1 à 39 jours	40 à 80 jours	80 jours
Cas avec souches identiques. .	13	1	3	9
Cas avec souches différentes. .	11	2	5	4

auront, dès lors, plus de chances de comporter des lésions devenues *toutes* résistantes. Mais les cas traités le plus longtemps sont aussi, dans notre série, ceux dont le traitement *est le plus ancien* : les chances sont alors plus grandes pour que les lésions prélevées à l'autopsie soient déjà dues aux bacilles résistants *ayant essaimé*. Effectivement, dans la presque totalité de nos cas avec souches de titre identique (12 sur 13), le traitement était terminé depuis plus d'un mois (le plus souvent depuis plusieurs mois, voire un an ou deux), alors qu'il n'en était ainsi que six fois sur onze pour les cas avec souches différentes. Les cinq autres fois il s'agissait de traitements en cours lors du décès ou de l'intervention. Il est possible que les facteurs indiqués ici interviennent tous deux. De toute manière, c'est chez des sujets n'ayant pas été traités pendant très longtemps, et dont le traitement ne remonte pas trop loin, que l'on a le plus de chances d'isoler des souches de sensibilité différente.

C. FRÉQUENCE ET DEGRÉ DE LA RÉSISTANCE EN FONCTION DU NOMBRE DE BACILLES PRÉSENTS DANS LES LÉSIONS. — Ce point est très important à considérer. Nous donnons, dans le tableau II, le titre des souches en fonction de la teneur en bacilles des lésions d'où elles ont été isolées.

TABLEAU II. — Résistance en fonction du nombre des bacilles.

NOMBRE de colonies (par 0,01 g de tissu)	Total	TITRE DE LA SOUCHE		
		$\leq 10 \mu\text{g}$	50-100 μg	500 — $> 1\ 000 \mu\text{g}$
< 100 colonies. . .	31	15 = 48,5 p. 100	8 = 25,8 p. 100	8 = 25,8 p. 100
100-1 000 colonies.	28	4 = 14,5 p. 100	8 = 28,6 p. 100	16 = 57 p. 100
$> 1\ 000$ colonies .	46	5 = 10,9 p. 100	10 = 21,7 p. 100	31 = 67,4 p. 100
	105	24 = 22,9 p. 100	26 = 24,8 p. 100	55 = 52,3 p. 100

On voit que les souches résistantes sont d'autant plus fré-

quentes que la teneur des lésions en bacilles est plus élevée : lorsque cette teneur est de moins de 100 colonies, 48,5 p. 100 des souches sont sensibles, 25,8 p. 100 faiblement résistantes et 25,8 p. 100 fortement résistantes ; à l'inverse, lorsque la teneur est supérieure à 1 000 colonies, 10,9 p. 100 seulement des souches sont sensibles, 21,7 p. 100 faiblement résistantes et 67,4 p. 100 fortement résistantes. La différence est considérable.

Mais avant d'accepter ce résultat, on doit se demander s'il n'est pas dû à ce que les lésions les plus riches en bacilles appartiendraient, par hasard, à des cas ayant été traités particulièrement longtemps, puisque la durée du traitement a l'influence capitale que l'on sait sur la fréquence et le degré de la résistance. En examinant à ce point de vue les résultats, on obtient les chiffres suivants :

LÉSIONS venant de cas traités pendant	NOMBRE DE COLONIES (par 0,01 g)		
	< 100	100-1 000	> 1 000
1 à 40 jours.	3	3	5
40 à 80 jours.	10	11	13
Plus de 80 jours. . . .	18	14	28

Le seul écart un peu important est la proportion un peu plus forte de lésions donnant plus de 1 000 colonies parmi les cas ayant été traités plus de quatre-vingts jours. En fait, on sait que la résistance est presque toujours présente bien avant le quatre-vingtième jour ; la prolongation du traitement ne fait, en général, que l'intensifier [47]. On peut donc penser que le seul effet possible de cette particularité de notre statistique a été d'exagérer légèrement, parmi les lésions ayant donné plus de 1 000 colonies, la proportion de souches *très* résistantes ; mais la différence ne saurait être considérable.

Ainsi, la fréquence et l'intensité de la résistance sont bien fonction de la teneur des lésions en bacilles.

D. FRÉQUENCE ET DEGRÉ DE LA RÉSISTANCE EN FONCTION DE LA NATURE DES LÉSIONS. — Etant donné l'opposition majeure qui existe en matière de comportement bacillaire entre les lésions avec caséum solide et celles avec caséum ramolli, nous nous sommes servis de ce critère pour établir deux catégories de lésions : l'une comprenant les granulations, les nodules et les

infiltrations homogènes, où le caséum est surtout solide ; l'autre, comprenant les parois de cavernes et les plages de ramollissement, où le caséum est surtout liquide. Un troisième groupe comprend les ganglions broncho-médiastinaux. De plus, il a été tenu compte, pour chacun de ces groupes, du *nombre* de colonies isolées des foyers, puisque ce facteur a, à lui seul, une importance si grande. Les résultats sont donnés dans le tableau III.

On voit que la résistance est bien plus marquée pour les lésions à caséum ramolli que pour celles à caséum solide. Pour les lésions du premier groupe, on note 13,3 p. 100 de souches sensibles, 20 p. 100 de souches moyennement résistantes et 66,7 p. 100 de souches fortement résistantes, alors que les chiffres correspondants sont, pour les lésions du deuxième groupe, de 30,6 p. 100, 28 p. 100 et 41,6 p. 100. Les ganglions médiastinaux montrent des chiffres voisins de ceux des lésions à caséum solide. ce qui tient à ce que les lésions ganglionnaires ne sont presque jamais ramollies chez les phthisiques. On notera aussi que parmi les cas comportant des souches différentes (tableau I), la lésion fournissant la souche la plus résistante est sept fois une caverne et deux fois seulement une lésion nodulaire ; une fois la différence se joue entre deux cavernes.

Toutefois, si les lésions avec caséum ramolli sont celles où la résistance est la plus fréquente, ce sont aussi celles dont la teneur en bacilles est la plus élevée. Ces lésions ne fournissent, en effet, moins de 100 colonies que dans 13,3 p. 100 des cas, et elles en fournissent plus de 1 000 dans 60 p. 100, alors que les taux correspondants, pour les lésions à caséum solide, sont de 33 p. 100 et 28 p. 100 (tableau III). Cette plus forte teneur en bacilles des lésions ramollies, sur laquelle l'un de nous a déjà longuement insisté ailleurs [2], explique certainement en bonne partie leur tendance à fournir davantage de souches résistantes, conformément à ce que l'on a vu plus haut. *La nature de la lésion pourrait cependant intervenir aussi, indépendamment de sa teneur en bacilles.* Si l'on compare en effet les souches trouvées dans des lésions solides et dans des lésions ramollies de *teneur bacillaire égale*, on voit que les premières sont moins souvent résistantes : ainsi, pour les foyers ayant fourni plus de 1 000 colonies, on trouve, en cas de lésion solide, 3 souches sensibles, 3 souches faiblement résistantes et 4 souches fortement résistantes, alors que l'on trouve 1 souche sensible, 7 souches faiblement résistantes et 19 souches fortement résistantes en cas de lésion ramollie. Pour les foyers ayant fourni moins de 1 000 colonies, la tendance est la même, bien qu'un peu moins marquée. Le nombre de cas n'est toutefois pas assez élevé pour que l'on puisse se prononcer de manière formelle.

TABLEAU III. — Résistance en fonction de la nature des lésions.

NATURE de la lésion	NOMBRE de colonies par 0,01 g de lésion	TOTAL des lésions	TITRE DE LA SOUCHE		
			≤ 10 µg	50-100 µg	500 — > 1000 µg
Parois de caverne et caséum liquide.	< 400 colonies.	6 = 13,3 p. 100	2	2	2
	100-1 000 colonies.	12 = 26,6 p. 100	3	0	9
	> 1 000 colonies.	27 = 60 p. 100	1	7	49
	Total	45	6 = 13,3 p. 100	9 = 20 p. 100	30 = 66,7 p. 100
Nodules et plages de caséum solide.	< 400 colonies.	12 = 33 p. 100	6	2	4
	100-1 000 colonies.	44 = 39 p. 100	2	5	7
	> 1 000 colonies.	40 = 28 p. 100	3	3	4
	Total	36	11 = 30,6 p. 100	10 = 28 p. 100	15 = 41,6 p. 100
Ganglions broncho- médiastinaux.	< 400 colonies.	12 = 66,6 p. 100	7	3	2
	100-1 000 colonies.	3 = 16,7 p. 100	0	0	3
	> 1 000 colonies.	3 = 16,7 p. 100	0	0	3
	Total	18	7 = 38,8 p. 100	3 = 16,7 p. 100	8 = 44,5 p. 100

III. — DISCUSSION.

A. REMARQUES PRÉLIMINAIRES. — Avant d'examiner l'exacte signification de la coexistence de souches sensibles et de souches résistantes dans le poumon d'un même malade, il y a lieu de se poser le problème suivant. Les titrages, faits par la méthode indirecte, ont porté sur un maximum de 50 à 100 colonies par lésion. Or, on sait qu'en milieu liquide, une culture peut apparaître résistante alors qu'elle ne contient qu'une très faible proportion de bacilles résistants : d'après Wolinsky, Reginster et Steenken [48], 1 p. 1 000 d'individus résistants (pour une semence totale de 7×10^6 bacilles) suffisent à donner une culture positive en milieu de Youmans au quinzième jour ; d'après Mitchison [45], une proportion encore plus faible peut suffire. Supposons dès lors, dans deux lésions pulmonaires, une souche contenant une aussi faible proportion de bacilles résistants ; si le titrage n'a porté pour l'une de ces lésions que sur des colonies sensibles — chose facile, puisque la grande majorité des colonies isolées des deux lésions le sont — la souche paraîtra sensible ; et si pour l'autre lésion, le titrage a englobé une ou deux colonies résistantes, la souche paraîtra résistante ; on croira donc avoir affaire à deux souches différentes, alors qu'il s'agit de la même souche dont le hasard aura fait titrer des composantes mélangées différemment.

Il y a donc lieu d'examiner la structure des souches résistantes dans les cas où coexistent des souches sensibles et résistantes. Si cette structure comporte une proportion importante de bacilles résistants, il y a très peu de chances pour qu'une souche isolée d'une autre lésion du malade, et apparaissant sensible, soit en fait la même souche résistante dont seules les variantes sensibles auraient été titrées. Dans le cas contraire, l'éventualité dont nous venons de parler ne peut être exclue, et l'incertitude quant à l'identité ou la différence des deux souches subsiste.

Pour connaître la structure d'une souche résistante, on compare le nombre de colonies qu'elle donne sur milieu de Löwenstein non streptomyciné et celui qu'elle donne sur le milieu de Löwenstein le plus fortement streptomyciné qui soit compatible avec sa croissance. (Dans nos 11 cas, il s'agissait neuf fois du milieu à 1 000 μg .) Dans les cas 2 et 20, cette étude n'a pas été faite ; dans les autres cas, elle a donné les résultats suivants :

Croissance sur milieu non streptomyciné :	
Croissance sur milieu streptomyciné :	
> 50 p. 100	3 cas
10 à 50 p. 100	5 cas
< 1 p. 100	1 cas

On voit que, dans 8 cas sur 9, la teneur de la souche la plus résistante en bacilles résistants a été suffisante pour que l'éventualité discutée plus haut puisse être exclue (3 cas), ou apparaisse extrêmement peu vraisemblable (5 cas). Il n'en est pas de même dans le neuvième cas (n° 13), où la teneur de la souche la plus résistante (titre 500 μ g) en bacilles résistants est inférieure à 1 p. 100 ; là, l'identité ou la différence des souches isolées de lésions différentes ne peut être affirmée de manière certaine.

On remarquera encore le point suivant. Dans 6 cas (10, 13, 19, 20, 24, 27), une souche étiquetée sensible, ou très faiblement résistante, provenait de lésions si pauvres en bacilles (de 1 à 13 colonies pour 0,01 g de tissu), que le titrage n'avait pu porter que sur quelques colonies. Dans de pareils cas, l'incertitude signalée plus haut devient encore plus grande, puisque, même riche en bacilles résistants, la souche résistante isolée du même malade contient encore assez de bacilles sensibles pour que le hasard ait pu faire figurer ces seuls bacilles parmi ceux isolés de la lésion paucibacillaire. Là, le diagnostic entre identité et différence des souches devient totalement impossible.

Les faits qui viennent d'être exposés montrent que la différenciation de souches isolées de deux lésions d'un même malade ne peut pas toujours être faite de manière certaine, et même qu'il existe en ce domaine toute une gamme d'approximations. A cette difficulté s'en ajoute une autre, beaucoup plus grossière, d'ordre technique. Dans un poumon très riche en lésions, il est impossible de prélever un foyer de telle façon que l'on puisse être sûr de sa non-contamination par les bacilles d'un foyer voisin. Cette cause d'erreur, qui n'est pas seulement théorique, doit tendre dans une certaine mesure à uniformiser les différentes souches d'un poumon, plus exactement, à diminuer indûment le nombre de cas d'où l'on isole des souches de sensibilité différente.

Des faits interviennent donc — et en sens opposé — pour empêcher de connaître l'exacte fréquence du phénomène étudié ici. Mais ce phénomène n'en existe pas moins et l'on doit, dès lors, s'interroger sur son mécanisme ainsi que sur ses conséquences d'ordre clinique et thérapeutique.

B. MÉCANISME. — La streptomycino-résistance n'était pas encore assez répandue, lors du début du traitement de nos malades, pour que l'on puisse raisonnablement penser qu'il y ait eu chez eux contamination successive par des souches de sensibilité différente. Il s'agit très certainement de la différenciation, en deux ou plusieurs lésions, d'une souche initialement la même. Pour quelle raison cette différenciation s'est-elle produite ?

On pourrait concevoir qu'il y ait eu, *dès le début des deux*

lésions, distribution différente des variantes résistantes qui existent dans les souches sensibles avant le début du traitement, qu'il y en ait eu dans l'une des lésions et non dans l'autre, d'où la différenciation ultérieure. La chose est très peu probable, parce que le nombre de bacilles donnant naissance à une lésion dans les conditions naturelles est très faible — au maximum de quelques centaines [2] — alors que le nombre de bacilles nécessaire pour trouver une variante résistante est très élevé (10^5 , Pyle [16] ; 10^6 , Yegian et Vanderlinde [19]). Cette cause ne peut donc intervenir que de manière tout à fait accidentelle.

On peut penser, par contre, que c'est au *rythme de multiplication bacillaire très différent* existant parfois dans deux lésions pulmonaires qu'il y a lieu d'attribuer en grande partie la différenciation de la souche. Un rythme rapide explique à la fois une plus fréquente *apparition* de variantes résistantes — lesquelles naissent pas mutation (Demerec [9]), et les mutations sont plus nombreuses lorsque la cellule bactérienne se divise plus activement — et une plus importante multiplication de ces variantes spontanément apparues. Or, c'est bien pour les lésions les plus riches en bacilles que la résistance se voit le plus fréquemment. La chose avait déjà été rendue très vraisemblable par diverses études cliniques, montrant la prédominance de la résistance dans les tuberculoses les plus graves radiologiquement (Howard, Maresh, Müller, Yanitelli et Woodruff [41] ; Howlett, O'Connor, Sadusk, Swift et Beardsley [42] ; Davy et Tison [8]) et les plus évolutives (Canetti et Lacaze [3]) ; elle est rendue hors conteste par les chiffres apportés plus haut, qui montrent un rapport direct entre la teneur des lésions en bacilles et la fréquence, ainsi que le degré, de la streptomycino-résistance. On se souvient que cette teneur est bien plus forte dans les foyers avec caséum ramolli que dans les foyers avec caséum solide, et que c'est aussi des premiers que les plus nombreuses souches résistantes sont isolées. La différence est même probablement plus marquée encore que ne le montrent nos chiffres, car les foyers solides sont chronologiquement plus récents, en moyenne, que les foyers ramollis (puisque le temps supplémentaire du ramollissement leur a manqué), et peuvent, dès lors, fort bien en être des *métastases*, d'autant plus que les foyers ramollis, de par leur structure et de par leur richesse en bacilles, essaient très facilement. Dès lors, puisqu'un foyer solide à bacilles résistants peut être tout aussi bien la métastase d'un foyer ramolli à bacilles résistants qu'un foyer à bacilles initialement sensibles différenciés sur place, c'est-à-dire, puisque le taux global de résistances montré par les foyers solides comprend encore autre chose que les résistances apparues sur place, la différence existant en ce domaine entre foyers solides et ramollis est encore plus forte qu'elle ne

paraît de prime abord. Pour éliminer ce facteur, il faudrait pouvoir n'opérer que sur des foyers solides *déjà présents avant l'apparition de la résistance dans les foyers ramollis*, ce qui n'est possible que dans des circonstances exceptionnelles. De toute manière, la différence entre foyers riches en bacilles et foyers pauvres en bacilles, en matière de fréquence de la résistance, est hors conteste, et l'on peut en inférer que le rythme inégal de multiplication bacillaire selon les lésions est un facteur important de différenciation des souches.

Reste un dernier facteur, *l'inégale pénétration de la streptomycine dans les lésions*. On ne possède à cet égard aucune donnée certaine, sinon celle de l'absence de pénétration de la streptomycine dans les foyers caséux étendus de certaines adénopathies cervicales. Ce serait un travail prometteur que de combler cette lacune, par exemple en injectant de la streptomycine peu d'heures avant une exérèse pulmonaire pour tuberculose, et en établissant les concentrations de streptomycine présentes dans différents foyers du poumon enlevé. En attendant, on ne peut faire sur l'inégale *sélection* des variantes résistantes selon les foyers — sélection qui serait fonction de la concentration du foyer en streptomycine — que des hypothèses, sur lesquelles il est inutile de s'étendre. On remarquera toutefois le point suivant. Certains auteurs (Linz [13], Hauduroy et Rosset [10]) admettent que la streptomycine a, en plus de son action sélective, une action *d'induction active de la résistance*. Si cette hypothèse encore peu étayée devait se confirmer, le rôle joué par d'inégales concentrations lésionnelles de streptomycine dans la différenciation des souches prendrait une importance toute particulière.

C. CONSÉQUENCES CLINIQUES ET THÉRAPEUTIQUES. — Il n'est guère besoin d'insister sur les éclaircissements que les faits décrits plus haut apportent à l'étude *clinique* de la streptomycino-résistance, telle qu'elle se fait chez les malades par le titrage des bacilles des crachats. Ils éclairent à la fois la marche habituelle et les atypies du phénomène. Les crachats ne peuvent contenir que les bacilles des foyers ouverts dans les bronches ; ces foyers-là, ramollis, sont aussi les plus bacillifères, donc ceux dans lesquels la résistance se développe le plus souvent ; rien d'étonnant, dès lors, à ce que la résistance des bacilles des crachats soit un phénomène très fréquent lorsqu'il n'y a point eu stérilisation des crachats par la streptomycine. L'évolution ultérieure du phénomène s'explique de même : *persistance de la résistance*, lorsque ni les défenses naturelles de l'organisme, ni quelque traitement associé à la streptomycine ne viennent à bout de la lésion (ou des lésions) d'où sortent les bacilles résistants ; *disparition des bacilles*, à l'inverse, lorsque ces facteurs en viennent à bout (ou

aboutissent à ce que la lésion soit exclue des bronches) ; auquel cas les bacilles résiduels qui y persistent sont nécessairement des bacilles résistants et donnent lieu ultérieurement, s'il y a rechute aux dépens de ce foyer, à une tuberculose où existent d'emblée des bacilles résistants.

Quant aux atypies, elles consistent essentiellement en un *retour temporaire des bacilles des crachats à la sensibilité* ; Crofton et Mitchison [6], puis Mitchison [14] en ont apporté d'instructifs exemples. Ce phénomène s'explique par l'ouverture, dans les bronches, d'un foyer jusque-là exclu dont les bacilles étaient restés sensibles (faits qui ont justement des chances d'être liés, puisque ces foyers, solides, sont plus pauvres en bacilles) ; à quoi il faut ajouter vraisemblablement l'exclusion temporaire, des bronches, du foyer ramolli ayant donné jusque-là les bacilles résistants, car même une arrivée nouvelle de bacilles sensibles en grand nombre ne donnerait pas aux bacilles des crachats le caractère global de la sensibilité, s'il n'y avait pas, simultanément, tarissement de la source des bacilles résistants. Quant au caractère habituellement temporaire de ce retour à la sensibilité, bien des raisons peuvent l'expliquer : réouverture du foyer à bacilles résistants, fermeture du foyer à bacilles sensibles et, plus encore, développement rapide de la résistance dans ce foyer, à la faveur de l'enrichissement en bacilles qu'apporte presque toujours l'ouverture d'un foyer dans les bronches. Il est inutile de décrire et d'interpréter toutes les autres atypies encore possibles ; on conçoit qu'elles s'expliquent par le jeu variable des deux facteurs décrits ici, la différence de sensibilité bacillaire existant dans différents foyers du poumon, et leur état d'ouverture ou de non-ouverture dans les bronches.

D'un point de vue *thérapeutique*, les faits qui viennent d'être décrits fournissent une explication aux cas où la poursuite de la streptomycinothérapie, après apparition de la résistance dans les crachats, s'est avérée utile. Cette utilité n'est guère concevable pour les foyers d'où viennent les bacilles résistants, c'est-à-dire les foyers ramollis, mais elle l'est pour les foyers coexistants à bacilles sensibles, c'est-à-dire essentiellement les foyers nodulaires. Ces foyers-là pourraient être de deux ordres : les uns, dont nous avons parlé tout au long de ce travail, qui existent d'emblée et où la différenciation de la souche initiale ne s'est pas faite ; quant aux autres, ce seraient les métastases d'un foyer à bacilles résistants, foyer où la souche résistante serait encore si riche en bacilles sensibles que la métastase pourrait fort bien être due à ces seuls bacilles. (Parmi nos cas, seul le cas 13 pourrait nous avoir montré de pareilles lésions.) De toute manière, sur ces foyers à bacilles sensibles, il est bien évident que la streptomycine peut avoir une action ; mais si l'on juge les choses

dans la perspective *globale* du cas, cette action est fort limitée, puisqu'elle ne s'exerce pas sur les foyers déjà devenus résistants, qui ont toutes chances d'être les plus bacillifères et, partant, les plus difficiles à guérir. Une streptomycinothérapie de cet ordre ne pourrait donc avoir que des objectifs assez limités. Au demeurant, on peut penser que l'emploi de plus en plus systématique de deux médications anti-bacillaires associées, en diminuant considérablement la fréquence de la streptomycino-résistance, diminuera progressivement le nombre de cas pour lesquels un aussi médiocre expédient thérapeutique pourrait être envisagé.

RÉSUMÉ.

1° 24 poumons de sujets tuberculeux ayant été soumis à la streptomycine sont étudiés quant à la résistance des bacilles isolés de différentes lésions. Dans 8 cas, les souches isolées des différentes lésions d'un même malade ont toutes le même titre ; dans 5 cas, les titres diffèrent légèrement, sans que les différences soient sûrement significatives ; dans 11 cas enfin, les titres diffèrent fortement et traduisent de réelles différences de sensibilité entre les souches considérées. Dans 7 de ces 11 cas, il y a coexistence de lésions à bacilles sensibles et de lésions à bacilles résistants (dépassant 1 000 μ g dans 5 cas) ; dans 4 cas, il y a coexistence de lésions à bacilles faiblement résistants et de lésions à bacilles fortement résistants.

2° C'est chez des sujets n'ayant pas été traités pendant très longtemps et dont le traitement ne remonte pas trop loin, que l'on a le plus de chances d'isoler des souches de sensibilité différente.

3° La fréquence et le degré de la résistance des souches isolées des lésions sont en raison directe de la teneur des lésions en bacilles. Ainsi, les lésions ayant donné moins de 100 colonies ont fourni 48,5 p. 100 de souches sensibles, 25,8 p. 100 de souches modérément résistantes et 25,8 p. 100 de souches très résistantes ; pour les lésions ayant donné plus de 1 000 colonies, les taux correspondants ont été de 10,9 p. 100, 21,7 p. 100 et 67,4 p. 100.

4° Les lésions à caséum ramolli fournissent plus souvent des souches résistantes que les lésions à caséum solide. Cette différence est due principalement à ce que les premières sont beaucoup plus riches en bacilles que les secondes ; mais il n'est pas exclu que la nature des lésions intervienne aussi par elle-même, indépendamment de leur teneur en bacilles.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. R. ARMSTRONG et A. M. WALKER. *Can. Med. J.*, 1949, **60**, 383.
- [2] G. CANETTI. Le bacille de Koch dans la lésion tuberculeuse du poumon. Ed. Méd. Flammarion, Paris, 1946.
- [3] G. CANETTI et H. LACAZE. *Rev. Tub.*, 1950, **14**, 685.
- [4] G. CANETTI et A. SAENZ. *Ces Annales*, 1949, **77**, 611.
- [5] *The Lancet*, 1948, 862.
- [6] G. CROFTON et D. A. MITCHISON. *Brit. Med. J.*, 1948, 1009.
- [7] Minutes of the 8th Strep. Conf., 1949, 360.
- [8] P. E. DAVY et F. TISON. *Rev. Tub.*, 1950, **14**.
- [9] DEMEREC. *J. Bact.*, 1948, **56**, 63.
- [10] P. HAUDUROY et W. ROSSET. *Rev. Tub.*, 1950, **14**, 805.
- [11] W. L. HOWARD, F. MARESH, E. E. MÜLLER, S. A. YANITELLI et G. F. WOODRUFF. *Am. Rev. Tub.*, 1949, **59**, 391.
- [12] K. S. HOWLETT JR., J. B. O'CONNOR, J. F. SADUSK JR., W. E. SWIFT JR et F. A. BEARDSLEY. *Am. Rev. Tub.*, 1949, **59**, 402.
- [13] R. LINZ. *Ces Annales*, 1950, **78**, 105.
- [14] D. A. MITCHISON. *Thorax*, 1950, **5**, 144.
- [15] D. A. MITCHISON. *Thorax*, 1950, **5**, 162.
- [16] M. PYLE. *Proceed. Staff. Meet. Mayo Clinic.*, 1947, **22**, 406.
- [17] A. SAENZ et G. CANETTI. *Rev. Tub.*, 1949, **13**, 746.
- [18] E. WOLINSKY, A. REGINSTER et W. STEENKEN JR. *Am. Rev. Tub.*, 1948, **58**, 335.
- [19] D. YEGIAN et R. J. VANDERLINDE. *J. Bact.*, 1948, **56**, 177.
- [20] P. G. YOUNG et A. G. KARLSON. *Am. Rev. Tub.*, 1947, **55**, 529.

SUBSTANCES ANTIGENIQUES ET HAPTÈNES POLYOSIDIQUES VI DE *SALMONELLA TYPHI*

par P. GRABAR et P. CORVAZIER (*).

(Institut Pasteur.)

L'insensibilité de certaines souches lisses de *Salmonella typhi* à l'action des agglutinines O, primitivement associée à la notion de virulence (Félix et Pitt, 1934 [6]), a été attribuée à la présence d'un nouvel antigène somatique (Vi), qui peut être mis en évidence par l'agglutination résiduelle de sérums Vi, préalablement épuisés par les antigènes O et II, en présence de suspensions Vi [7]. De telles suspensions perdent leur agglutinabilité Vi par chauffage à 70° pendant une heure, mais acquièrent en même temps une sensibilité aux agglutinines O. L'antigène Vi a été étudié du point de vue sérologique : Kauffmann, en particulier [13], distingue les formes V : O inagglutinables ; W : Vi inagglutinables, V-W : O-Vi agglutinables. La connaissance de cet antigène intéresse donc en premier lieu le simple diagnostic sérologique de souches isolées en cours d'infection (A. Bonnefoi et J. Grabar, 1946 [4]), puisqu'une souche sans antigène H et, de plus, O inagglutinable ne peut être diagnostiquée sérologiquement qu'en présence d'un sérum Vi. Cet antigène ne peut, d'autre part, être écarté de la notion de virulence depuis le travail initial de Félix et Pitt, lorsqu'on sait qu'il est toujours présent dans les souches fraîchement isolées [13, 15] et que le test même de virulence sur souris ne rappelle que de loin la virulence naturelle des souches telle qu'elle peut être étudiée par certaines techniques (Reilly, 1935 [15]).

La nature chimique et le comportement immunologique de l'antigène Vi (défini initialement par un phénomène sérologique d'agglutination) seront étudiés ici par les méthodes immunochimiques de précipitation quantitative mises au point par Heidelberger [12], et déjà utilisées pour l'étude de l'antigène trichloracétique O 901 ou de son haptène par P. Grabar, G. Hornus et J. Oudin [9, 10],

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 6 juillet 1950.

au moyen de substances solubles telles qu'on les obtient par les méthodes désormais classiques de Boivin et Mesrobeanu (1933) [3] ou de W. T. J. Morgan (1937) [14].

Notre étude portera successivement sur les modes d'extraction des substances antigéniques à partir des bactéries type Vi, l'étude immuno-chimique des extraits bactériens ainsi obtenus, l'étude immuno-chimique de systèmes précipitants O et Vi et enfin la recherche de l'isolement du polyside spécifique Vi.

PRÉPARATION DE FRACTIONS ANTIGÉNIQUES Vi.

Le choix des souches Vi utilisées ne peut s'appuyer, dans l'état actuel de la question, que sur le test d'inagglutinabilité O, par quoi Felix définit son antigène.

Les souches Watson et Ty2 ont été sélectionnées par Felix dans son travail initial ; si elles sont bien O inagglutinables, elles n'en provoquent pas moins, lorsqu'elles sont injectées, l'apparition d'agglutinines O, H et Vi. La souche Vi 1 de Bathnagar, par ailleurs, ne provoque la formation que d'un taux relativement faible d'agglutinines O et H. Ces trois souches semblent conserver leurs caractères après un grand nombre de repiquages : ce sont celles que nous avons étudiées ici. D'autre part, à titre de comparaison, nous avons préparé des antigènes à partir de la souche O 901 considérée comme ne renfermant que le seul antigène somatique O (tableau I).

TABLEAU I.

SÉRUMS anti-microbiens	SUSPENSION STANDARD		
	II	O	Vi
O 901	0	6 400	0
Watson	6 400	800	1 600
Vi 1	10	20	1 600
	400	800	3 200

TECHNIQUES. — Les germes, après deux repiquages successifs, sont ensemencés sur gélose ordinaire à base de bouillon de bœuf peptoné. Ils sont recueillis et lavés une fois dans de l'eau physiologique. La centrifugation se fait à froid. Nous sommes généralement partis du culot microbien humide pour préparer les extraits. Certaines cultures ont cependant, pour être conservées, été desséchées par trois lavages à l'acétone et un à l'éther. Nous mentionnerons à propos les préparations faites à partir des germes secs.

Plusieurs modes de préparation des antigènes microbiens ont

été utilisés, ceci dans le but d'améliorer le rendement pondéral en antigène soluble et ultérieurement en substance spécifique.

Nous nous sommes adressés à trois méthodes chimiques :

Celle de Boivin à l'acide trichloracétique, celle de Walker à l'urée (1940) [16] et celle de Morgan au diéthylène glycol [14]. Nous avons utilisé, d'autre part, une méthode physique : l'extraction sous l'action mécanique des ultrasons déjà pratiquée par Chambers et Flosdorf (1936) [5] sur *S. typhi*. Ces différents antigènes seront respectivement désignés dans cet article par les abréviations : antigènes t.c.a., ur., d.e.g., u.s., ne pouvant réserver le nom d'antigène à telle ou telle de ces préparations, si classiques fussent-elles, et en accord avec la définition immunologique de ce terme.

1° *Préparation de l'antigène Vi t.c.a.* — Nous avons mis en pratique la technique de Boivin et Mesrobianu dans les conditions suivantes : mise en suspension du culot microbien humide dans cinq fois son poids d'eau physiologique et adjonction d'un volume égal d'acide trichloracétique N/2 ; abandon trois heures à la glacière et centrifugation, dialyse du surnageant en sac de cellophane contre l'eau courante pendant quelques heures, puis contre de l'eau distillée à la glacière pendant quarante-huit heures, précipitation par 4 volumes d'alcool, centrifugation, dissolution dans un petit volume d'eau et nouvelle centrifugation. On répète deux fois cette précipitation alcoolique après légère acidification de la solution. L'antigène t.c.a. ainsi préparé se conserve bien en solution et c'est à cet état que nous l'avons prélevé pour les précipitations spécifiques. On note parfois, après un certain temps, un léger précipité qui est éliminé avant usage.

2° *Préparation de l'antigène Vi ur* (d'après la technique de Walker). — Les bactéries humides sont mises en présence d'une solution stérile 2,5 molaire d'urée, pendant neuf heures à 38°, puis une nuit à la glacière. La suspension est centrifugée le lendemain et le surnageant mis à dialyser à la glacière. Après une nouvelle centrifugation, la solution jaune, opalescente, a été traitée comme l'extrait dialysé de Boivin, par précipitation alcoolique et purification (dialyse et reprécipitation). La solution obtenue finalement, parfois moins stable que la précédente, n'est utilisée et étudiée qu'après avoir été abandonnée huit jours à la glacière où il se forme un léger dépôt.

3° *Préparation de l'antigène Vi u.s.* — Cette extraction a été faite à l'aide d'un générateur d'ultrasons S. C. A. M. utilisé déjà pour la désintégration des microbes [11], équipé avec un quartz piézo-électrique de fréquence : 960 Kc. A pleine puissance, l'intensité acoustique totale du faisceau ultrasonore est d'environ 76 watts (6,8 watts/cm²). On introduit les suspensions à irradier dans une cloche en verre dont le fond est formé d'une membrane en nitrocellulose transparente aux U. S. et imperméable à l'eau.

L'influence de certains facteurs a été étudiée sur les suspensions microbiennes. Globalement, les suspensions utilisées, faites à partir de germes secs ou humides, riches de 50 à 200 milliards de germes par centimètre cube, en suspension aqueuse, refroidie, ont subi l'action des ultrasons pendant un temps variable (généralement une demi-heure).

Les propriétés principales des fractions antigéniques étudiées sont groupées dans le tableau II. Les fractions t. c. a., type Boivin, ressemblent à celles décrites jusqu'à présent. Signalons cependant un assez fort pourcentage en azote (9,3 p. 100) d'un antigène t. c. a. obtenu à partir de la souche Vi 1.

TABLEAU II.

SOUCHE	MÉTHODE d'extraction	RENDEMENT pondéral p. 100	AZOTE de l'antigène p. 100	TOXICITÉ souris en mg
Vi 1	t. c. a.	4	9,3	0,1-0,2
	ur.	33	12,8	
	u. s.	83	13,1	2-3
O 901	t. c. a.	6,6	3	0,05-0,2
	ur.	13,4	7	
	u. s.	67	9	1
Watson.	t. c. a.	5	2,6	0,1-0,4
Ty. II	ur.	10	9	1,5-2

Les fractions ur. ont un pourcentage d'azote plus élevé que les fractions t. c. a. et leur rendement pondéral par rapport au poids des germes totaux est sensiblement plus grand. Les fractions u. s. que nous étudierons plus longuement ont un rendement pondéral encore plus élevé et la teneur en azote voisine celle des fractions ur.

Une suspension à 10^{10} par centimètre cube obtenue à partir de germes humides et soumise à l'action des ultrasons suit l'évolution suivante : entièrement opaque au début, la suspension se clarifie progressivement dès les premières minutes. Après une heure d'irradiation, cette clarification s'est très accentuée. La suspension est cependant très opalescente.

Des prélèvements faits de cinq en cinq minutes sur la suspension sont centrifugés dans les mêmes conditions à la fin de l'expérience ou examinés sur lame et colorés ; ils permettent de se rendre compte des faits suivants : l'aspect microscopique de la suspension se modifie surtout dans les vingt premières minutes ; aux bâtonnets rouges sur fond blanc du début, se substituent très rapidement des débris microbiens de plus en plus rares et petits, cependant que le fond se colore en rouge. A la fin de l'expérience, soixante minutes, il reste cependant, en dehors des débris, des germes apparemment intacts, ce que confirme d'ailleurs l'ensemencement.

Les surnageants de centrifugation d'opacité décroissante pendant une heure montrent cependant que le poids sec d'extrait soluble par unité de volume reste pratiquement constant. Enfin, l'analyse électrophorétique du surnageant de la suspension centrifugée après quinze et soixante minutes d'action des ultrasons montre une courbe asymétrique à un clocher dans le premier cas et une courbe à deux clochers distincts dans le second cas, ce qui indiquerait une dissociation du complexe antigénique initial. Le rendement pondéral après quinze heures est le même qu'après une heure d'action des ultrasons. Il est de l'ordre de 80 p. 100 en substance soluble. Si l'émulsion initiale est faite à partir de germes secs, le rendement est inférieur (65-70 p. 100), même en prolongeant l'action des ultrasons.

Stabilité de l'antigène sonique. — L'antigène en solution résiste à 8 000 tours/minute pendant trente minutes. Cette stabilité n'est cependant que relative ; les ultrasons amorcent probablement une dissociation [peut-être celle qui se traduit sur les clichés électrophorétiques] (fig. 6). Toujours est-il que : a) par dialyse de quelques heures de ces extraits il se forme lentement un dépôt assez abondant ; b) par simple séjour à la glacière il se forme de même un dépôt au bout de quatre à huit jours ; les dosages d'azote donnent alors un taux légèrement différent : 13,1 p. 100 avant dialyse, 12,7 p. 100 après dialyse. Cette fraction précipitée donne des réactions Molisch, biuret et Millon positives ; remise partiellement en solution, elle donne un test de précipitation positive avec des sérums anti-microbiens.

Nous utilisons, pour immuniser des lapins, pour faire précipiter des sérums et pour préparer le polyoside, des suspensions récemment soumises à l'action des ultrasons et centrifugées. Toutes ces préparations précipitent avec des sérums homologues et hétérologues dans les conditions décrites au paragraphe suivant.

La toxicité a été étudiée pour certaines de ces préparations. Les fractions riches en azote comme celles obtenues avec l'urée ou les ultrasons sont beaucoup moins toxiques : les fractions trichloracétiques Vi tuent la souris à des doses de l'ordre de 0,1 et 0,2 mg. Les fractions u. s. ne tuent plus qu'à des doses comprises entre 2 et 3 mg. Les souris utilisées pèsent de 16 à 18 g et sont mises en observation pendant trois jours (tableau II).

ETUDE IMMUNOCHIMIQUE DES EXTRAITS ANTIGÉNIQUES VI.

Les antigènes Vi t. c. a., ur et u. s. ainsi préparés servent à immuniser des lapins et à précipiter les immunosérums.

Les lapins, après un premier prélèvement de sang destiné à vérifier l'absence d'anticorps typhiques naturellement acquis.

subissent des injections alternativement sous-cutanées et intraveineuses de doses progressivement croissantes (0.01 mg à 0,50 mg) d'antigène, à raison de trois injections par semaine pendant six semaines. La dose totale injectée est de 2 à 4 mg. Le sang est prélevé stérilement par saignée à blanc après huit jours de repos.

Parmi les différents sérums préparés (sérum anti-microbien: Vi 1 ; anti-t. c. a. : Vi 1 ; Watson, O 901 ; anti-ur. : Vi 1 et Ty2 ; anti-u. s. : Vi 1 et O 901), nous étudierons maintenant les sérums anti-microbiens et anti-t. c. a. Vi 1.

1° *Sérum anti-microbien Vi 1.* — Préparé par injection massive d'une suspension microbienne formolée (10^6 à 10^9) dans les mêmes conditions de fréquence que précédemment.

Les antigènes t. c. a., ur. et u. s. précipitent ce sérum différemment et ces différences ont été étudiées à l'aide de la technique décrite par Heidelberger, Sia et Kendall (1930) [12], c'est-à-dire : détermination de la teneur en azote du précipité spécifique formé par addition à des volumes constants de sérum de quantités croissantes d'antigène et étude du pouvoir précipitant des surnageants de précipitation vis-à-vis d'un antigène homologue, hétérologue, ou de l'anticorps.

Ces techniques quantitatives ne sont applicables à l'étude des éléments des complexes spécifiques formés que si l'antigène atteint un certain degré de pureté. Aussi bien n'avons-nous demandé à ces techniques, dans le cas qui nous occupe, qu'une appréciation relative de la précipitabilité de différents antigènes.

Les courbes de précipitation obtenues avec les antigènes t. c. a. et ur. sont reportées sur la figure 1. Elles montrent que l'antigène ur. précipite à poids égal une plus grande quantité d'anticorps que l'antigène t. c. a. Le fait que l'antigène ur. possède un taux d'azote plus élevé que l'antigène t. c. a. est insuffisant pour expliquer la différence d'azote précipité par les deux antigènes.

La courbe de précipitation obtenue avec l'antigène u. s. est grossièrement semblable à celle obtenue avec l'antigène ur., ce qui n'implique pas l'identité des deux substances.

La figure 1 résume l'étude de l'épuisement du même sérum par différents antigènes et le pouvoir qu'ont les surnageants de précipiter avec tel antigène. Précisons que les graphiques en pointillé, en noir et en hachures se rapportent aux zones dans lesquelles précipitent respectivement l'antigène qui a servi à l'épuisement, le sérum initial (anticorps précipitant en zone d'excès d'antigène) et d'autres substances microbiennes antigéniques, lorsqu'elles sont mises en présence des surnageants aux différentes concentrations d'antigène indiquées en abscisse.

Nous pouvons constater que :

a) Le sérum anti-microbien mis en présence de quantités crois-

santes de chacun des antigènes t. c. a., ur. et u. s. est épuisé avec des quantités différentes de chacun d'entre eux. On note surtout les variations de l'étendue des zones de chevauchement, c'est-à-dire

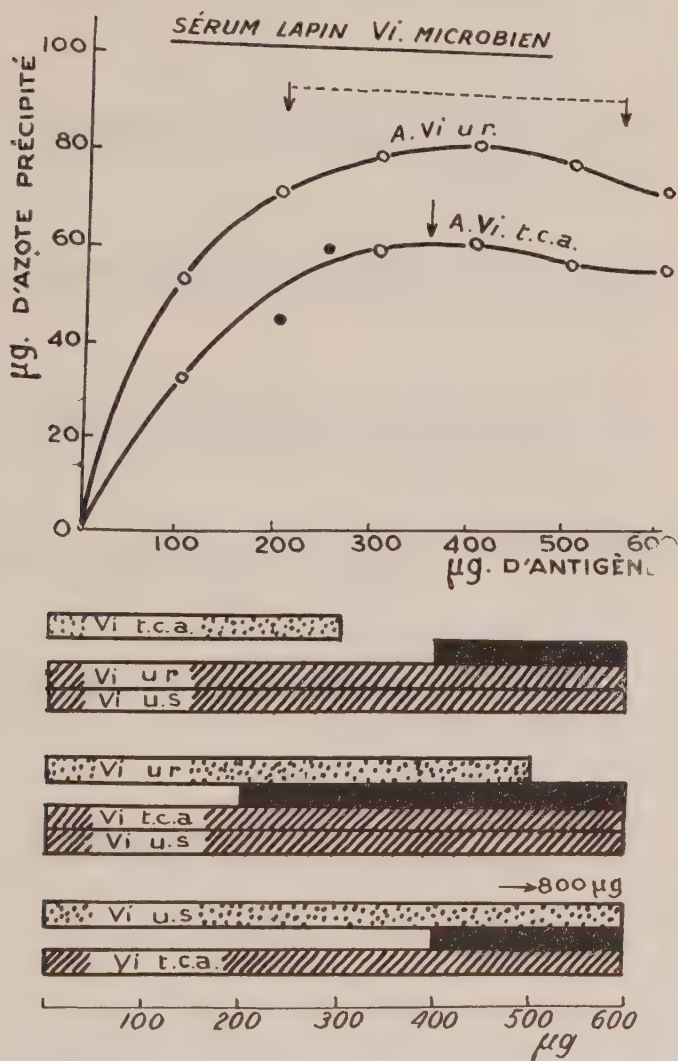


FIG. 1.

des zones où les surnageants précipitent à la fois avec l'antigène qui sert à l'épuisement et les anticorps précipitables par cet antigène. Les anticorps anti-t. c. a. sont épuisés par des quantités

relativement petites de cet antigène, tandis que les anticorps anti-ur. et surtout anti-u. s. ne sont épuisés que par de grosses quantités d'antigène ; il est aisé d'en conclure que les germes non traités possèdent davantage de groupements antigéniques communs

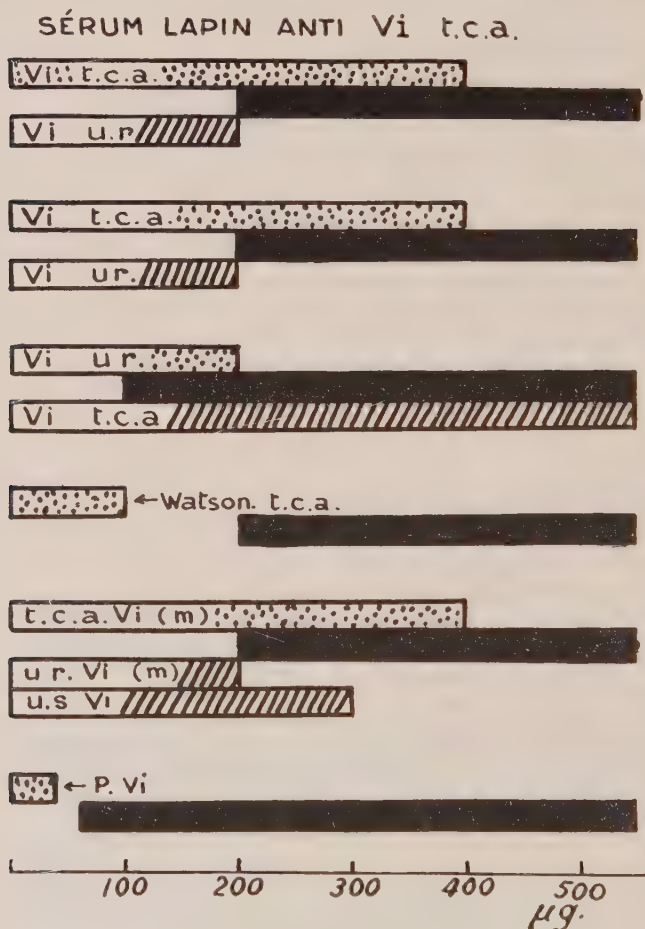


FIG. 2.

avec ces deux préparations, ur. et u. s., qu'avec l'antigène t. c. a. Par ailleurs, le pouvoir précipitant de l'antigène t. c. a. varie selon que l'on s'adresse au sérum microbien ou au sérum anti-t. c. a. homologue : vis-à-vis de ce dernier l'antigène se comporte comme une substance complexe puisque la zone de chevauchement est assez étendue (fig. 2) ; par contre (fig. 1), ce même antigène n'a

pas de zone de chevauchement et présente même une zone d'équilibre où aucun autre groupement antigénique ne précipite, ce qui semble prouver, les réactivités différentes des lapins mises à part, qu'une partie seulement des groupements de l'antigène t. c. a. peut réagir avec les anticorps du sérum anti-microbien. Le traitement trichloracétique révèle donc certains groupements antigéniques normalement inclus mais inactifs dans les corps microbiens.

b) L'épuisement du sérum anti-microbien par l'un des extraits antigéniques t. c. a., ur. ou u. s. n'épuise pas la possibilité de ce sérum de précipiter avec les autres antigènes, ce qui signifie, d'une part, qu'aucun antigène ne porte la totalité des groupements antigéniques des bactéries et qu'aucun d'entre eux ne possède, d'autre part, la même série de groupements antigéniques.

2° *Sérum anti-Vi t. c. a.* — Des lapins ont été immunisés avec deux préparations différentes de l'antigène t. c. a. faites à partir de la souche Vi 1.

Nous pouvons observer les faits suivants :

a) Dans le cas présent, les deux sérums (fig. 2) donnent des zones de chevauchement identiques et ces zones sont étendues : il s'agit donc d'un antigène complexe.

b) Ces sérums, épuisés avec l'antigène t. c. a., ne précipitent plus avec les antigènes u. s. et ur. et cet épuisement vis-à-vis de ces deux antigènes est obtenu avec une quantité environ deux fois moindre. Ces faits permettent de conclure qu'il existe des groupements antigéniques communs à ces trois extraits.

c) Un sérum anti-Vi t. c. a., épuisé avec l'antigène Vi ur. précipite encore avec l'antigène t. c. a. qui a servi à l'immunisation ; c'est donc que, ou bien l'antigène t. c. a. comporte un certain nombre de groupements différents, une partie seulement des groupements anticorps étant saturés par l'antigène ur., ou bien l'antigène ur. comporte les mêmes groupements antigéniques que l'antigène t. c. a. mais cachés par sa plus grande complexité moléculaire.

d) L'épuisement par la substance polyosidique Vi (voir plus bas) est obtenu avec de petites quantités (40 μ g) ; la zone d'inhibition est très réduite, analogue à celle que l'on obtient avec le polyoside O 901 vis-à-vis d'un sérum anti-t. c. a. O 901 [9].

PRÉCIPITABILITÉ ET POUVOIR PROTECTEUR D'UN SÉRUM DE CHEVAL ANTI-VI (ANTIGÈNE TRICHLORACÉTIQUE) ET DE SES FRACTIONS.

L'étude des fractions euglobuliniques et pseudoglobuliniques des sérums de chevaux en particulier a permis à certains auteurs [41 bis] de différencier les réactivités immunologiques d'un sérum total et de ses fractions, de préciser ainsi les ou la partie protectrice seule intéressante du point de vue thérapeutique. Nous

avons cherché si une telle discrimination était possible avec un sérum de cheval immunisé avec l'antigène t. c. a., souche Vi 1.

Immunisation. — Deux chevaux ont été immunisés avec l'antigène t.c.a. Vi 1, à des doses croissantes, à raison de deux injections sous-cutanées par semaine. La dose totale injectée en l'espace de quatre mois a été de 50 mg. Des saignées ont été pratiquées en cours d'immunisation pour contrôler la précipitabilité du sérum. Après huit jours de repos une grosse saignée a été pratiquée.

Fractionnement. — Le sérum, qui a été abandonné quelques semaines

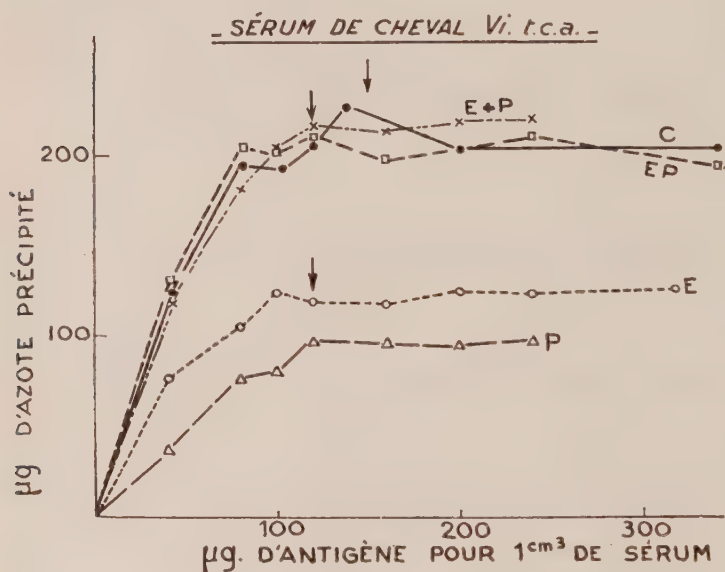


FIG. 3.

à la glacière en présence de merthiolate, a été fractionné de la manière suivante :

a) On précipite les euglobulines par adjonction de 9 volumes d'eau saturée en CO_2 . On laisse vingt-quatre heures à la glacière et on centrifuge. Les euglobulines sont alors dissoutes dans le volume initial d'un sérum normal.

b) On précipite les pseudoglobulines par adjonction au surnageant précédent d'un volume égal de sulfate d'ammonium à saturation, on abandonne vingt-quatre heures à la température de laboratoire et on centrifuge. Les pseudoglobulines sont reprises en solution dans de l'eau physiologique.

Les courbes de précipitation (fig. 3) obtenues en mettant en présence des quantités croissantes d'antigène t. c. a. Vi 1 et des quan-

tités constantes du sérum de cheval (C), d'une de ses fractions euglobulinique (E) ou pseudoglobulinique (P) et du mélange de ces deux fractions (E P), montrent que :

a) La courbe de précipitation avec le sérum complet (C) est celle d'un antigène complexe. La zone de chevauchement est très réduite et suivie d'un plateau.

b) Les courbes des fractions euglobuliniques (E) et pseudoglobuliniques (P) ont des tracés à peu près identiques, ce qui indique que le pouvoir précipitant est à peu près également réparti dans les deux fractions.

c) La somme (E + P) de l'azote anticorps précipité par chaque fraction à différentes concentrations d'antigène restitue le tracé obtenu avec le sérum complet, avec cependant un sommet moins individualisé.

d) Enfin, la courbe obtenue avec le mélange des deux fractions (E P) donne un tracé analogue au précédent.

Le pouvoir protecteur du sérum de cheval et de ses fractions a été étudié selon la méthode classique qui consiste à injecter le sérum protecteur par voie intrapéritonéale, une demi-heure avant la suspension de culture d'une souche qui tue la souris à 10^7 de germes, ici Ty2, par la même voie. La quantité de germes injectés pour l'étude de la protection, le double de la dose minima mortelle, est de 10^7 de germes pour 0,5 cm³. De plus, si la dose minima mortelle tue toutes les souris en l'espace de vingt-quatre heures, le pouvoir protecteur a été étudié sur soixante-douze heures. Ces deux précautions restreignent fortement les probabilités de survies non motivées par le pouvoir protecteur.

Le tableau III résume les résultats obtenus. On y trouvera les survies après vingt-quatre heures et après soixante-douze heures. Il permet de conclure au pouvoir protecteur du sérum complet et de ses fractions. Le nombre restreint de souris utilisées ne peut

TABLEAU III.

	TÉMOINS	SÉRUM complet	SÉRUM complet	EUGLOB.	PSEUDOGLOB.
Nombre de souris.	7	4	4	4	4
Quantité de sérum		0,5	0,5	0,5	0,5
Quantité de germes virulents injectés (millions).	100	200	300	200	200
Nombre de souris mortes :					
En 24 heures	7	0	0	0	0
En 72 heures	7	0	1	2	1
Rapport.	7/7	0/4	1/4	2/4	1/4

permettre d'affirmer que le pouvoir protecteur est particulièrement localisé dans une des deux fractions, mais laisse penser qu'il est du même ordre de grandeur dans ces deux fractions.

PRÉCIPITATION CROISÉE O-VI.

Nous n'avons pas cherché à obtenir des systèmes précipitants spécifiquement O ou Vi, mais, dans un système Vi, la part qui pouvait revenir à des groupements anticorps anti-O.

Pour cela, nous nous sommes servis de sérums anti-Vi obtenus par injection d'antigènes t. c. a., ur. et u. s. à des lapins et avons étudié leur comportement vis-à-vis des antigènes Vi et O.

Un sérum anti-Vi t. c. a. précipite très faiblement avec l'antigène O préparé de la même manière. Les courbes de précipitation (fig. 4) en présence d'antigènes t. c. a. O 901 et Watson (O+Vi) indiquent que le premier précipite comme un antigène simple dont les groupements sont rapidement saturés (30 μ g suffisent à saturer 1 cm^3 de sérum), tandis que 150 μ g du second sont nécessaires à saturer 1 cm^3 de sérum. Aucun d'eux ne possède de zone de chevauchement. L'antigène t. c. a. Watson précipite cependant comme un antigène complexe.

De même, un sérum anti-Vi ur. précipite faiblement avec l'antigène O 901 t. c. a. (fig. 4), tandis qu'il précipite fortement avec l'antigène homologue.

Certains sérums obtenus par immunisation avec l'antigène Vi trichloracétique ne précipitent pas avec l'antigène O correspondant. C'est donc que l'acide trichloracétique peut extraire des germes O et Vi des antigènes spécifiques. Avec ces antigènes t. c. a., la précipitation croisée O, Vi est donc, quand elle existe, faible. Par contre, les sérums précipitants obtenus à partir d'antigène u. s. O et Vi (respectivement 8 p. 100 et 12,7 p. 100 d'azote) et mis en présence de l'antigène hétérologue précipitent très abondamment. La richesse en azote de ces antigènes rendrait difficiles à interpréter les courbes d'azote d'anticorps précipité. Nous nous sommes donc adressés seulement aux surnageants d'épuisement pour étudier les zones de précipitation. La figure 5 résume graphiquement l'étude des sérums anti-u. s. O et Vi. Les épuisements inverses : A (sérum O par la fraction Vi) et C (sérum Vi par la fraction O) montrent cependant des zones de précipitation semblables. Cette précipitation ne peut être due, étant donné ce que l'on sait actuellement des mosaïques d'antigènes, qu'aux protéides microbiens qu'il est difficile de considérer comme les supports de spécificité des types O ou Vi.

Par ailleurs, l'épuisement du sérum Vi, préparé avec l'antigène sonique, par l'antigène homologue (B) montre une très large zone

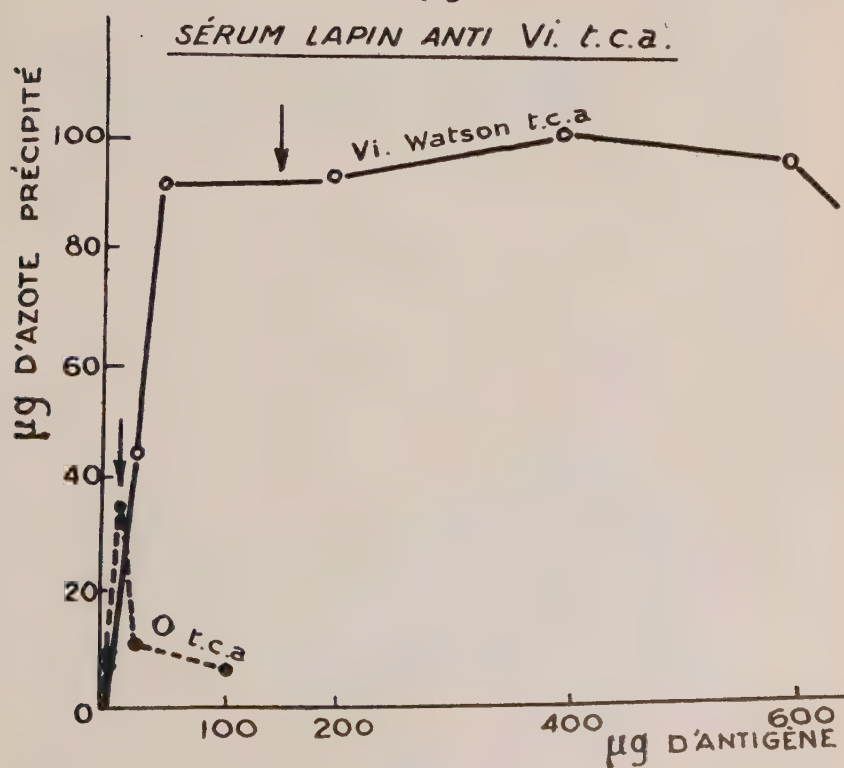
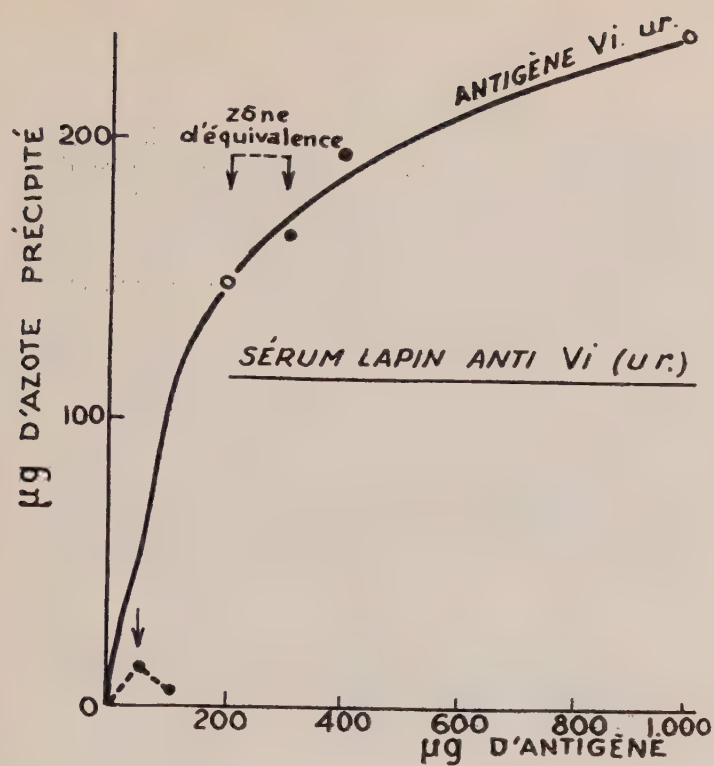


FIG. 4.

d'équivalence, ce qui va de soi puisqu'il s'agit d'un mélange très complexe. On notera, pour un même sérum, la différence des zones de chevauchement en B et C, selon qu'il s'agit d'un épuisement par l'antigène homologue (B) ou hétérologue (C). Cette différence signifie que les groupements précipitinogènes communs aux antigènes u. s. Vi et O ne forment qu'une partie de ces antigènes et qu'il reste donc un grand nombre de groupements spécifiques. Ceci est prouvé aussi par les diagrammes A et C où l'on constate, après épuisement d'un sérum par l'antigène hétérologue, une

SÉRUM LAPIN ANTI O901 (u.s.) ÉPUISÉ AVEC Vi (u.s.)



SÉRUM LAPIN ANTI Vi (u.s.) : ÉPUISÉ PAR Vi (u.s.)



SÉRUM LAPIN ANTI Vi (u.s.) : ÉPUISÉ AVEC O (u.s.)

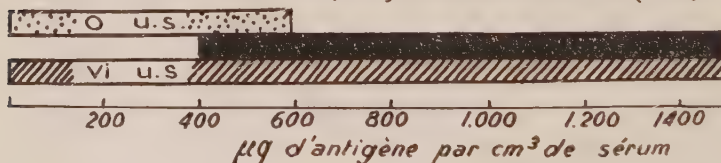


FIG. 5. — Les schémas correspondent, de haut en bas, aux expériences : A, B et C (v. texte).

précipitation résiduelle abondante avec l'antigène homologue. Ces résultats ne font que confirmer, au moyen des réactions spécifiques de précipitation, les résultats déjà connus par l'agglutination.

PRÉPARATION ET PROPRIÉTÉS D'UNE SUBSTANCE POLYOSIDIQUE Vi.

L'hydrolyse acétique douce ou forte (0,5 à 5 p. 100) de solutions d'antigènes trichloracétiques (souches Watson et Vi 1) au bain-marie bouillant n'amène aucune dissociation du complexe, même après douze heures d'hydrolyse. Dans les mêmes conditions, l'antigène t. c. a. O 901 est clivé et floccule après une demi-heure ou une heure d'hydrolyse douce. Le polyoside spécifique O reste

dans le surnageant. Il faut noter que lorsque l'antigène Vi est riche en azote, il se produit une floculation rapide mais, dans ces conditions, le surnageant ne précipite pas par l'alcool et présente une réaction de Molisch négative : il ne contient, par conséquent, pas ou peu de polyoside. Le culot de centrifugation, par contre, remis en solution, au besoin à l'aide de soude diluée, précipite avec un sérum anti-Vi dans les mêmes proportions que l'antigène initial.

Après avoir essayé différents procédés d'hydrolyse ou de dégradation chimique, nous nous sommes fixés sur l'hydrolyse par l'acide picrique en solution saturée, comme l'ont pratiqué Binkley et Goebel (1945) [2] sur un antigène de Shigella.

Le rendement pondéral d'une telle préparation est faible lorsque l'on part d'un antigène déjà purifié par un des procédés classiques (ac. trichloracétique, diéthylèneglycolle ou digestion tryptique). Aussi sommes-nous partis d'un antigène u. s. dont le rendement pondéral est déjà important ; il n'y a pas de raisons, *a priori*, pour que les antigènes purifiés contiennent la majorité ou la totalité des polyosides spécifiques, ni que l'antigène u. s. contienne un polyoside moins purifiable.

TECHNIQUE. — Nous décrivons, à titre d'exemple, les fractions obtenues au cours d'une hydrolyse (tableau IV). Une solution à 1,2 p. 100 d'antigène ultra-sonique (600 mg) est saturée par l'acide picrique à 22°. Il se produit dès cet instant un précipité assez abondant, jaune pâle qui, isolé par centrifugation, lavé, dialysé et reprécipité plusieurs fois par l'alcool se montre à l'analyse être un complexe riche en azote, précipitant spécifiquement avec un sérum anti-microbien Vi (N : 11,7 p. 100 ; Molisch + ; biuret +. Ces réactions sont faites sur des quantités correspondant à 1 mg du poids sec d'antigène). L'hydrolyse est poursuivie pendant une

TABLEAU IV. — Fractionnement antigène Vi. u. s., 600 mg.

HYDROLYSE, ACIDE PICRIQUE A SATURATION, 90 MIN. A 100°	
I. — Culot insoluble. Lavé par acétone neutre.	II. — Phase aqueuse picrique. Extraite à l'éther. Précipitée par alcool 80 p. 100.
A. — Insoluble acétone. Poids, 107 mg. Complexe précipitant spécif. Azote, 11 p. 100.	D. — Fraction lipidique, 45 mg.
B. — Soluble acétone pH 4,5-5,5. Poids, 160 mg. Complexe précipi- tant spécif. Azote, 3,8 p. 100.	E. — Fraction polyosidique brute. Azote, 4,8 p. 100. Molisch + biuret : négatif. Précipite spécifiquement. Poids, 68 mg.
C. — Soluble acétone extrait à l'éther. Poids, 27 mg.	F. — Sevage et reprécipitations. Azote, 2,5 p. 100. Poids, 22 mg. Rende- ment : 3,6 p. 100 à partir de l'anti- gène ; 2,7 p. 100 à partir des germes:

heure et demie au bain-marie bouillant en présence du précipité. On refroidit et on centrifuge.

Le surnageant est extrait à l'éther (douze fois), dialysé pendant trois jours à froid contre de l'eau distillée, concentré sous vide à 30°-40° et précipité deux fois par six volumes d'alcool : après centrifugation et lavage à l'acétone le précipité est desséché sous vide phosphorique. On obtient 68 mg d'une substance polyosidique brute qui est facilement soluble dans l'eau en presque totalité, donnant une solution claire légèrement brune (N : 4,8 p. 100 : précipite spécifiquement avec un sérum Vi) ; après chaque précipitation, la resolubilisation n'est pas intégrale ; on élimine alors le résidu insoluble.

Le culot de centrifugation de l'hydrolysate est lavé à l'acide picrique saturé, puis à l'acétone. Le lavage à l'acétone entraîne, lorsqu'on ne prend pas la précaution d'acidifier cette dernière, une partie du culot en solution opalescente : cet entraînement est maximum autour de pH 4,5-5 et devient pratiquement nul à pH 6 ; la substance opalescente obtenue (B) est dialysée, concentrée, précipitée par l'alcool à froid deux fois et remise en solution (N : 3,8 p. 100 ; sol. opalescente à peu près stable ; Molisch + ; Biuret et ac. trichloracétique + ; précipitation spécifique avec un sérum Vi). La partie du culot insoluble dans l'acétone (A) est soumise à la dialyse, ce qui permet de la remettre à peu près entièrement en solution ; le résidu insoluble est éliminé ; après un traitement identique à celui de la fraction précédente, cette solution est aussi très opalescente (N : 11 p. 100 ; les autres réactions sont semblables). Ces deux fractions réagissent spécifiquement avec un sérum anti-Vi. Il s'agit donc de fractions dont l'hydrolyse a été insuffisante pour dissocier le complexe. Ces fractions n'ont pas été étudiées plus longuement.

La fraction brute obtenue à partir de la phase aqueuse de l'hydrolysate est mise en solution acidifiée, et agitée en présence de chloroforme et d'alcool octylique jusqu'à ce qu'il ne se forme plus d'insoluble à l'interface ; après lavage du chloroforme la solution aqueuse est dialysée, concentrée et précipitée par l'alcool à 80 p. 100 ; cette précipitation est recommencée trois fois jusqu'à ce que le précipité se dissolve intégralement. On récupère alors 22 mg d'un produit (F) à 2,9 p. 100 N. (Millon, ac. trichloracétique et biuret : négatifs ; $[\alpha]_D^{20} = 61^\circ$; Molisch : positif) qui réagit spécifiquement avec des sérums Vi anti-microbiens et anti-t. c. a., mais ne précipite pas ou faiblement avec un sérum anti-O.

La teneur en azote, élevée pour une préparation polyosidique, nous a déterminés à rechercher et doser la glucosamine après hydrolyse acide ; deux heures sont nécessaires pour libérer tout le sucre aminé en présence de HCl 2N au bain-marie bouillant.

Le taux de glucosamine présente (5,6 p. 100) ne rend que partiellement compte de la teneur en azote.

L'analyse électrophorétique (fig. 6) rend compte du degré de pureté de cette substance. La migration fait apparaître trois ou quatre frontières différentes et chaque clocher présente une base relativement large ; il s'agit donc d'un mélange de produits d'hydrolyse puisque la courbe électrophorétique de l'antigène ultrasonique initial ne présentait que deux sommets, moins individualisés.

La toxicité très faible, de l'ordre de 10 mg pour la souris, n'est



FIG. 6. — Courbes électrophorétiques des fractions antigéniques provenant d'une suspension de *Salm. typhi* après quinze minutes (a) et soixante minutes (b) d'irradiation ultrasonore et centrifugation. Courbe électrophorétique d'un haptène polysidique Vi (c).

pas comparable à celle des complexes antigéniques dont nous sommes partis.

L'antigénicité a été étudiée en injectant à plusieurs lapins des quantités croissantes de la substance selon la méthode habituelle d'immunisation. Au total, 4 à 5 mg ont été injectés en l'espace de six semaines. Les sérums prélevés après une semaine de repos montrent que si les préparations polysidiques P_1 et P_3 ne réagissent avec aucun des immunosérums ainsi obtenus, P_2 au contraire réagit faiblement en présence du sérum homologue (tableau V). Des trois préparations polysidiques, deux se comportent donc comme des haptènes vrais, c'est-à-dire ne peuvent provoquer chez le lapin l'apparition d'anticorps précipitants ; le troisième P_2 est faiblement antigénique, ce fait pouvant provenir d'une insuffisance de

purification comme d'une faible antigénicité de la substance spécifique Vi. Même après ultrafiltration sur des membranes dont le diamètre moyen des pores $2R = 50 \text{ m}\mu$ est suffisant pour arrêter normalement l'antigène O [10], cette substance garde une faible antigénicité.

TABLEAU V.

	RENDEMENT pondéral p. 100	AZOTE p. 100	TOXICITÉ souris en mg	PRÉCIPITATION du sérum anti-polios. par polyos. homologue
P ₁	2,7	2,9		Non précipitant
P ₂	2,6	6,6	8	Précipitant
P ₃	3,3	u. f. 4,2 (1) 5	10	Non précipitant
(1) u. f. Cette préparation a été ultra-filtrée.				

Un sérum anti-t. c. a. Vi précipite avec cette substance (P₃) qui est cependant insuffisante à précipiter la totalité des groupements spécifiques ; ceci concorde avec les observations faites sur la précipitation, par le polyoside O 901, de sérums anti-O [9].

Nous sommes donc en présence d'une substance polyosidique Vi dont la spécificité devra être étudiée vis-à-vis de sérums anti-O et dont la non-toxicité permet d'entrevoir l'utilisation comme facteur d'immunisation et de protection éventuelle après avoir été associée à une grosse molécule ou après avoir subi tout autre traitement susceptible de la rendre antigénique (1).

CONCLUSIONS.

1° Différentes fractions microbiennes ont été préparées à partir de souches particulièrement riches en agglutinogène Vi et de la souche O 901 : extraction chimique par l'acide trichloracétique, le diéthylèneglycol et l'urée ; extraction mécanique par l'action des ultrasons ; les fractions les moins riches en azote (t. c. a.) s'avèrent les plus toxiques (0,1 à 0,6 mg), tandis que les extraits riches en azote (u. s.) le sont beaucoup moins (1,5 à 3 mg). L'action des

(1) Pendant la rédaction de ce mémoire, nous avons pris connaissance, dans une publication japonaise, du travail de M. Ashida [1] qui obtient une substance glucidique Vi spécifique qui semble différer de la substance que nous avons obtenue par les trois points suivants : préparation à partir de la souche Ty2, hydrolyse alcaline, insolubilité à pH 4,5. Nous espérons reproduire ces expériences afin de comparer ces deux substances entre elles.

u. s. permet d'obtenir, sous forme de suspension assez stable, 80 p. 100 en poids du contenu microbien total ; poursuivie, elle permet d'obtenir une ébauche de dissociation décelable à l'électrophorèse.

Ces préparations, toutes antigéniques, précipitent spécifiquement avec un sérum anti-microbien homologue.

2° L'étude immunochimique de ces fractions microbiennes montre qu'il s'agit de complexes antigéniques, l'extrait trichloracétique étant le plus simple d'entre eux. Ils possèdent tous des groupements antigéniques communs, mais aucun d'entre eux ne possède les groupements suffisants pour provoquer la formation des anticorps nécessaires à bloquer la totalité des groupements des autres extraits.

Une partie des groupements antigéniques de la fraction t. c. a. se trouve, dans les corps microbiens, voilée par les substances plus complexes que contiennent les autres extraits antigéniques et particulièrement l'extrait sonique, qui serait donc plus naturel.

3° Le pouvoir précipitant et le pouvoir protecteur d'un sérum de cheval immunisé avec l'antigène Vi t. c. a. sont répartis également entre les fractions euglobulines et pseudoglobulines.

4° La précipitation croisée des antigènes O et Vi a été étudiée au moyen de sérums précipitants obtenus à partir des antigènes trichloracétiques à faible teneur, et à partir des fractions u. s. à forte teneur en azote.

La précipitation croisée des sérums anti-Vi t. c. a. par l'antigène O est très faible ; le point d'équivalence voisine 70 μg d'antigène, alors qu'il est autour de 250 μg pour le système homologue Vi.

La précipitation des sérums anti-u. s. Vi par la fraction u. s. O 901 est très abondante, les points d'équivalence se situant autour de 500 μg d'antigène par centimètre cube de sérum pour les systèmes hétérologues et 700 μg pour les systèmes homologues. Ce qui établit la disparité sérologique des antigènes trichloracétiques O et Vi et une parenté O-Vi probablement limitée aux protéides microbiens dans les conditions de l'expérience. Une étude chimique plus poussée devra préciser le comportement des polysides, mais l'analyse électrophorétique montre leur hétérogénéité.

5° L'hydrolyse acétique suffisante à obtenir le polyside à partir de l'antigène t. c. a. O 901 est insuffisante à dissocier l'antigène Vi. L'hydrolyse par l'acide picrique à saturation de la fraction u. s. permet d'obtenir une fraction Vi hydrosoluble limpide, ne présentant pas, en présence de 1 mg de substance, les réactions des protéides et des polypeptides, contenant 3-5 p. 100 d'azote, donnant une réaction de Molisch positive (à partir de 50 μg environ), donnant un pouvoir rotatoire $[\alpha]_{72}^D = 61^\circ$, précipitant spéci-

liquement un sérum anti-Vi et pratiquement atoxique pour la souris. Le taux de glucosamine après hydrolyse ne rend compte qu'en partie de la teneur en azote de cette substance, qui se révèle hétérogène à l'analyse électrophorétique.

Les sérums de lapins immunisés avec les fractions polyosidiques P_1 et P_3 ne précipitent pas avec ces fractions (la préparation P_2 , par contre légèrement antigénique et riche en azote, est probablement insuffisamment purifiée). Il s'agirait donc d'une substance hapténique vraie.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] T. ASHIDA. *Japan. J. exp. Med.*, 1949, **20**, 181.
- [2] F. BINKLEY, W. F. GOEBEL et E. PERLMAN. *J. exp. Med.*, 1945, **81**, 331.
- [3] A. BOIVIN et J. et L. MESROBEANU. *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **113**, 490.
- [4] A. BONNEFOI et J. GRABAR. *Ces Annales*, 1946, **72**, 719.
- [5] L. A. CHAMBERS et FLOSDORF. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1936, **34**, 631.
- [6] A. FELIX et R. M. PITT. *J. Path. a. Bact.*, 1934, **38**, 409.
- [7] A. FELIX et R. M. PITT. *Lancet*, 1934, **2**, 186.
- [8] A. FELIX, S. S. BATHNAGAR et R. M. PITT. *Brit. J. exp. Path.*, 1934, **15**, 346.
- [9] P. GRABAR et G. HORNU. *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **131**, 244. *Ibid.*, 1940, **133**, 58. *Ces Annales*, 1941, **66**, 136.
- [10] P. GRABAR et J. OUDIN. *Ces Annales*, 1947, **73**, 627.
- [11] P. GRABAR et M. ROUYER. *Ces Annales*, 1945, **71**, 154.
- [11 bis] P. GRABAR et A.-M. STAUB. *Ces Annales*, 1945, **71**, 385.
- [12] M. HEIDELBERGER, R. M. P. SIA et F. KENDALL. *J. exp. Med.*, 1930, **52**, 477. *Ibid.*, 1935, **61**, 559.
- [13] F. KAUFFMANN. *Die Bakteriologie der Salmonella Gruppe*, Copenhagen, 1941.
- [14] W. T. J. MORGAN. *Chem. Ind.*, 1937, **56**, 446.
- [15] J. REILLY, E. RIVALIÈRE, A. COMPAGNON, R. LAPLANE et H. DU BUIT. *Ann. Med.*, 1935, **37**, 182 et 241.
- [16] WALKER. *Biochem. J.*, 1940, **34**, 325.

ÉTUDE DE DEUX ESPÈCES NOUVELLES DU GENRE *SPHEROPHORUS*

par P. TARDIEUX (*)

(Institut Pasteur. Service des Anaérobies.)

Parmi les espèces anaérobies Gram-négatives pathogènes, les bactéries du genre *Spherophorus* forment un ensemble bien distinct, tant par l'aspect morphologique que par la nature des lésions chez l'homme ou l'animal infecté. Ce sont, en effet, les agents d'une nécrose viscérale à localisations multiples, en particulier pulmonaires, hépatiques, articulaires, osseuses, séreuses, génitales et ganglionnaires, qui aboutit à la formation d'un pus épais, grumeleux, parfois fétide. L'infection peut être très grave, c'est alors le tableau de la septicopyohémie à *S. funduliformis*, ou au contraire torpide. On doit rattacher à ce genre un certain nombre de saprophytes des voies digestives, dénués de pouvoir pathogène mais qui en possèdent tous les caractères génériques.

Prévot, en 1948 [1], comptait déjà 17 espèces et, depuis la parution de la 2^e édition de son Manuel, en a décrit une nouvelle : *S. ridiculosus* [2]. Depuis quelques années, nous avons retrouvé la plupart d'entre elles chez l'homme ou chez l'animal. Nous avons pu en poser facilement le diagnostic précis par le caractère des cultures, chaque fois que celles-ci s'accompagnaient d'un développement gazeux nettement appréciable. Au contraire, les souches non gazogènes qui ont été étudiées jusqu'ici au laboratoire des Anaérobies de l'Institut Pasteur ont rarement pu être rattachées à l'une des trois espèces précédemment décrites, qui sont :

S. floccosus (Courmont et Cade, 1900) ;

S. influenzaeformis (Rüss, 1905) ;

S. caviae, agent de l'adénite cervicale purulente bénigne du cobaye, décrit par Vinzent en 1928 sous le nom de *Streptobacillus caviae* [3], qui se sépare des deux précédents par son pouvoir pathogène particulier et son caractère de sérophilie obligatoire en culture.

Récemment, nous avons eu l'occasion d'étudier 5 souches nouvelles qui présentaient entre elles de grandes analogies, en particulier l'absence de dégagement gazeux et l'exigence d'une albumine fraîche d'origine animale, de préférence le sérum, dans

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 14 décembre 1950.

les milieux d'entretien. Aucune d'entre elles pourtant ne répond, par ses caractères culturels ou biochimiques, à la description de *S. caviae*, aucune n'est capable de reproduire chez le cobaye ou le lapin les lésions caractéristiques indiquées par Vinzent.

Il paraît donc logique de considérer l'existence d'une ou plusieurs nouvelles espèces du genre *Spherophorus* dans le groupe « non gazogène et sérophile obligatoire ».

Voici la provenance de ces souches récentes :

1° Origine vétérinaire : *Souche 462*, isolée dans le pus d'un abcès du pis chez une vache par J. J. Monteverde (Argentine) qui en a fait la première observation et nous l'a adressée.

2° Origine humaine : *Souche 542*, isolée dans le pus d'un abcès du talon avec ostéite du calcanéum (*) consécutif à une morsure de chien.

Souche 564 B, isolée dans une septicémie puerpérale par O. Ernst (Hambourg).

Souche 564 C, isolée dans un pyosalpinx par O. Ernst.

Souche 590 A, isolée dans une plaie de guerre infectée, à l'Institut Pasteur de Saïgon.

Les deux premières sont très proches l'une de l'autre, les trois dernières ont tous leurs caractères communs. Mais, entre les souches 462 et 542 d'une part, 564 B, 564 C et 590 A d'autre part, il existe de très nettes divergences ; les premières utilisant très peu les sucres et ne modifiant ni le lait, ni la gélatine, les dernières au contraire liquéfiant la gélatine, acidifiant tous les sucres, coagulant le lait en peu de temps et attaquant légèrement le caillot, douées enfin d'un pouvoir pathogène plus constant vis-à-vis du cobaye.

Il semble donc que l'on puisse décrire deux espèces nouvelles dont nous allons donner les caractéristiques.

Espèce A, pour laquelle nous proposons le nom de
Spherophorus abscedens Tardieux et Monteverde.

Morphologie : Bâtonnet Gram-négatif, polymorphe dans les premières cultures où il présente simultanément des formes ovales de 2 à 3 μ , à espace clair central, et des formes allongées, flexueuses, présentant des métachromasies, des images de pseudo-ramifications et des renflements sphéroïdes latéraux ou terminaux qui donnent des figures en massues ou en haltères.

Au cours des repiquages successifs, les formes courtes prédo-

(*) Ce pus nous avait été adressé par le Dr J. Box. L'examen bactériologique en a été fait dans notre laboratoire avec la collaboration de C. Mazurek.

minent, en milieu liquide surtout, tandis qu'un certain polymorphisme subsiste en gélose profonde.

Physiologie : C'est un anaérobie strict, immobile et dépourvu de cils, ne sporulant pas.

Sa conservation est assez bonne, pouvant atteindre deux à trois mois. Mais un chauffage de quelques minutes à 60° suffit à le tuer. Une souche était très réductrice, l'autre beaucoup moins.

Les cultures ne sont obtenues que par l'adjonction aux milieux d'une albumine animale fraîche telle que celle du sérum. Elles ne produisent ni gaz, ni odeur.

En bouillon VF glucosé + sérum, un trouble homogène apparaît en vingt-quatre à quarante-huit heures.

En gélose VF profonde + sérum, la culture est plus lente. Les

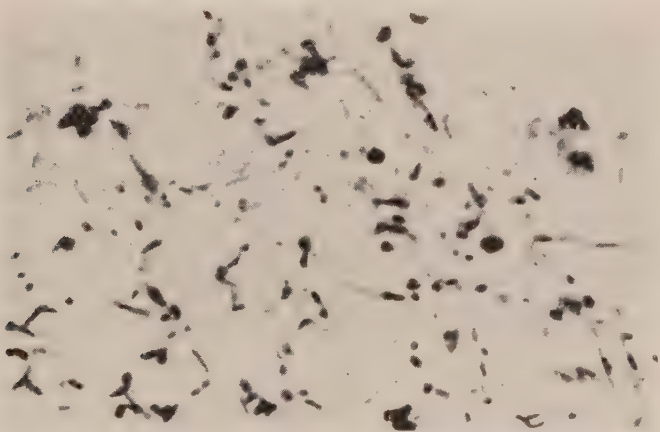


FIG. 1. — *Spherophorus abscedens*.
Aspect de culture d'une semaine en gélose profonde.

colonies sont punctiformes et deviennent parfois lenticulaires.

L'eau peptonée n'est troublée que très légèrement, mais il y a formation d'indol.

Le pouvoir glucidolytique est très faible et ne se manifeste que sur glucose et galactose.

Les protéines coagulées ne sont pas attaquées.

Le lait et la gélatine ne sont pas modifiés.

Biochimie : Les nitrates ne sont pas réduits en nitrites. La fermentation du bouillon VF glucosé produit les acides acétique, butyrique et lactique, de l'ammoniac, une faible quantité de SH_2 , de l'indol et parfois des crésols et de l'acétoïne. Ni amines, ni alcools, ni cétones.

Pouvoir pathogène : Les deux souches étudiées ont été isolées d'infections localisées, abcès nécrotiques consécutifs, l'un certainement et l'autre probablement, à une morsure.

Expérimentalement, l'inoculation au lapin, au cobaye et à la souris a été parfaitement tolérée, quelle que fût la voie utilisée. Nous n'avons trouvé ni toxine, ni hémolysine.

Espèce B, pour laquelle nous proposons le nom de
Spherophorus glycolyticus Tardieux et Ernst.

Morphologie : Bâtonnet Gram-négatif très semblable au précédent. On retrouve les éléments ovalaires à coloration bipolaire, des bacilles flexueux, des métachromasies et des sphéroïdes.

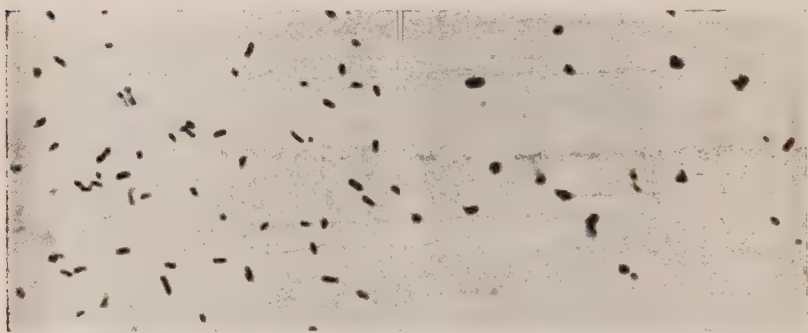


FIG. 2.

FIG. 3.

FIG. 2. — *Spherophorus glycolyticus*. Formes bacillaires.

FIG. 3. — *Spherophorus glycolyticus*. Formes soufflées et sphéroïdes.

Physiologie : Cet anaérobie strict n'est pas cilié ; il est donc immobile. Il ne sporule pas. Il peut vivre un à deux mois dans les milieux de culture, mais est tué en quelques minutes à 70°. Son pouvoir réducteur est faible : le rouge neutre et la phénosafranine, réduits les premiers jours, se recolorent progressivement. Les cultures ne sont pas gazogènes, mais abondantes et légèrement fétides dans les milieux additionnés de sérum frais.

En bouillon VF glucosé, on obtient alors en vingt-quatre heures un trouble abondant et homogène.

En gélose profonde, les colonies sont punctiformes ou lenticulaires.

En eau peptonée, même avec sérum, le trouble reste discret.

La gélatine est liquéfiée mais assez tardivement et souvent après plus d'un mois.

Au contraire, le lait est rapidement coagulé et le caillot subit un début de digestion.

Les protéines chauffées ne sont pas attaquées.

Les glucides subissent une fermentation énergique, acide mais non gazeuse ; nous avons vérifié ce fait sur le glucose, le galactose, la lévulose, le saccharose, le lactose, le maltose, la glycérine et l'amidon.

Biochimie : Le type fermentaire est, comme pour l'espèce précédente, acéto-butyrique-lactique. On obtient encore, à partir de VF glucosé, du SH_2 , de l'ammoniac, de l'acétone, des traces d'aldéhydes et de scatol. Ni amines, ni alcools.

Les nitrates ne sont pas réduits en nitrites.

Pouvoir pathogène : Deux souches ont été isolées d'infections génitales. La troisième d'une plaie de guerre infectée.

Expérimentalement, l'inoculation au lapin de 2 cm³ d'une culture jeune en bouillon par voie veineuse a été bien supportée. Au contraire, l'inoculation au cobaye a toujours entraîné un amaigrissement et la mort en dix à quinze jours, mais nous n'avons trouvé, à l'autopsie, ni les lésions locales, ni les lésions viscérales que l'on pouvait attendre.

Nous pensons que les bactéries ont agi par leur pouvoir toxique, à partir de petits foyers cryptiques, peut-être osseux ou articulaires.

In vitro, pourtant, il n'y a production d'aucune substance toxique ou hémolytique dans les filtrats de culture.

POSITION DANS LA SYSTÉMATIQUE. DISCUSSION.

Deux caractères essentiels : l'absence de gaz dans les milieux et la sérophilie obligatoire, nous permettent de rattacher ces deux espèces à un groupe de *Spherophorus* dont *S. caviae* était jusqu'ici le seul représentant, auquel elles ne sauraient être assimilées. Rappelons que l'agent de l'adénite purulente du cobaye ne fermente pas les glucides, ne donne ni SH_2 , ni indol dans les cultures, ne trouble pas le bouillon, mais y cultive en grumeaux.

Il faut noter que Henriksen, en 1948 [4], a décrit deux espèces bactériennes hémophiles et non gazogènes, l'une dans un cas de pyémie, associée à d'autres anaérobies, l'autre dans des cas d'endométrites, d'abcès pulmonaire et d'abcès périnéal. Cet auteur hésitait à les classer dans le genre *Bacteroides* (Castellani et Chalmers) ou dans un autre. Mais les microphotographies qu'il apporte semblent être la preuve d'une morphologie très comparable à celle des *Spherophorus*.

Cependant, l'exigence en culture est beaucoup plus accusée que celle de nos souches ; au point que Henriksen n'a obtenu en milieu liquide qu'une croissance extrêmement faible. En consé-

quence, il n'a pu rechercher les caractères fermentaires et biochimiques qui nous auraient seuls permis d'affirmer que nos souches pouvaient être identifiées aux siennes ou en étaient nettement distinctes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A.-R. PRÉVOT. *Manuel de Classification et de Détermination des Anaérobies*, 2^e édit., 1948.
- [2] A.-R. PRÉVOT. Actinomycétale anaérobie stricte nouvelle *Sphaerophorus ridiculosus*, n. sp., ces *Annales*, 1948, **75**, 387.
- [3] R. VINZENT. Le bacille de l'adénite cervicale bénigne du cobaye. Ces *Annales*, 1928, **42**, 529.
- [4] S. D. HENRIKSEN. Studies on Gram negative anaerobes. *Acta Path. Microb. Scand.*, 1948, **25**, 363 et 368.

ANTIBIOTIQUES ET LYSÉ BACTÉRIOPHAGIQUE

VIII. — L'ACTION DE L'AURÉOMYCINE SUR LA LYSÉ BACTÉRIOPHAGIQUE ÉTUDIÉE AU MICROBIOPHOTOMÈTRE

par MICHEL FAGUET et EWALD EDLINGER.

(*Institut Pasteur. Service du Bactériophage.*)

En poursuivant les études de P. Nicolle et M. Faguet [1, 2] et nos propres recherches [3, 4, 5, 6] au sujet de l'action conjuguée des antibiotiques et du bactériophage sur une culture staphylococcique, au moyen du microbiophotomètre de M. Faguet [7], nous nous sommes proposé d'étudier les influences qu'exercerait éventuellement l'auréomycine sur l'allure de la lyse bactériophagique.

Technique. Les six cuves de l'appareil reçoivent chacune 20 cm³ d'eau peptonée (à 1,5 p. 100 de peptone UCLAF et 0,1 p. 100 de glucose) préalablementensemencée avec 100 000 à 200 000 germes par centimètre cube provenant d'une culture de dix-huit heures sur gélose inclinée. Comme dans les expériences antérieures, nous avons utilisé le staphylocoque Twort et son bactériophage homonyme qui ne donne qu'exceptionnellement des cultures secondaires (P. Nicolle et P. Ducrest [8]). La quantité de bactériophage employée était toujours sensiblement la même, c'est-à-dire 0,1 cm³ d'un lysat titrant $8 \cdot 10^9$ corpuscules au centimètre cube dans chaque cuve. La quantité de corpuscules était ainsi toujours sensiblement égale à $4 \cdot 10^7$ corpuscules par centimètre cube de la culture, au moment de l'introduction du bactériophage.

L'auréomycine utilisée dans nos expériences provenait d'échantillons commerciaux (Auréomycine Lederlé) en ampoules contenant 100 mg de poudre ; nous avons dilué cette quantité dans 100 cm³ d'eau bidistillée stérile. La solution était ensuite conservée à la glacière. De cette solution mère nous avons préparé extemporanément des dilutions appropriées à nos expériences. Ainsi nous avons pu éviter en grande partie la destruction de l'antibiotique signalée par M. Aitoff [9]. D'autre part, la faible quantité d'antibiotique dont nous disposions nous a obligés à utiliser les solutions mères pendant des périodes allant jusqu'à quinze jours. Néanmoins la diminution de l'activité antibiotique était trop faible pour amener une perturbation dans les résultats des différentes expériences.

Expériences. Trois expériences différentes ont été effectuées :

1° La culture bactérienne a reçu en même temps le phage et différentes concentrations d'antibiotique.

2° La culture bactérienne a été d'abord soumise à l'action de l'antibiotique et a reçu ensuite le phage.

3° La culture bactérienne a reçu d'abord le phage et en second lieu l'auroémycine.

Pour chaque groupe d'expériences, nous avons effectué de

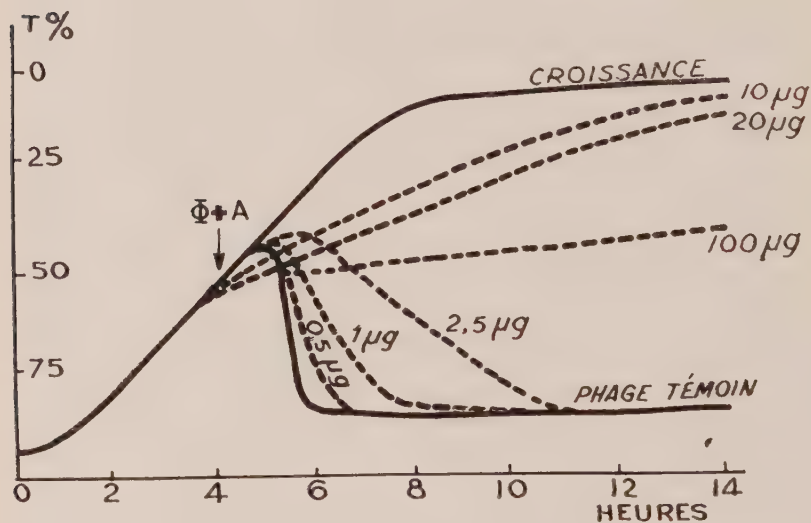


FIG. 1. — Action du phage et de différentes doses d'auroémycine ajoutées simultanément.

Les courbes « croissance » et « témoin bactériophage » montrent la croissance normale et la lyse phagique normale après addition du phage. † Intervention. Les courbes en pointillés figurent les variations d'opacité d'une culture après l'addition du phage et de la dose d'auroémycine (0,5, 1, 2,5, 10, 20 µg par centimètre cube de culture).

multiples essais mais pour ne pas surcharger les tableaux, nous n'avons reproduit ici que les courbes des expériences les plus caractéristiques.

Dans ces conditions, la courbe de croissance présente son aspect habituel ; si on ajoute le phage au milieu de la phase exponentielle, on observe après une heure et demie un éclaircissement brusque et total de la culture correspondant à la lyse bactériophagique.

Si on ajoute différentes doses d'auroémycine en même temps que le phage, les phénomènes suivants sont observés (fig. 1).

Une concentration de l'antibiotique inférieure à $2,5 \mu\text{g}$ par centimètre cube n'empêche pas la lyse de se produire. Cette lyse reste totale, mais elle perd son caractère brusque. Son évolution est d'autant plus ralentie que la dose de l'antibiotique est plus élevée. Si la culture ne contient que $0,5 \mu\text{g}$ d'auréomycine par centimètre cube, la lyse n'est retardée que d'une demi-heure par rapport à celle qui se produit dans la culture témoin. Mais lorsque $2,5 \mu\text{g}$ d'antibiotique sont ajoutés par centimètre cube de

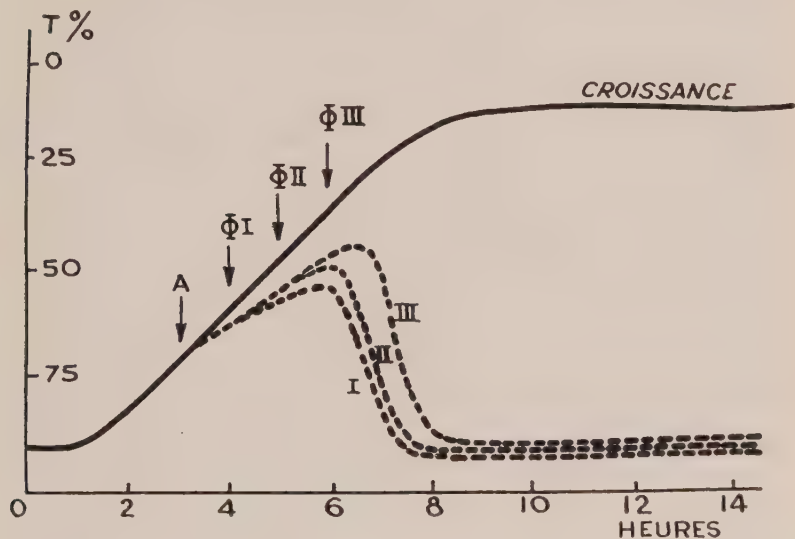


FIG. 2. — Action de l'auréomycine sur la lyse lorsque le phage est ajouté à la culture après l'antibiotique.

La courbe « croissance » montre la croissance normale de la culture, au moment A, addition de $1 \mu\text{g}$ d'antibiotique par centimètre cube de culture. ∇ Intervention. Le phage ϕ est ajouté dans les cultures soumises à l'effet de l'auréomycine à I, II et III. Les courbes correspondantes sont désignées également par I, II, III.

milieu, la lyse n'atteint son achèvement qu'en six heures. A la concentration de $10 \mu\text{g}$ d'auréomycine par centimètre cube, ou plus, la lyse ne se produit plus. Quoique l'étude de l'action de l'auréomycine sur la croissance bactérienne soit réservée à une publication ultérieure, il nous paraît utile de signaler dès maintenant que l'auréomycine, même à la concentration de $200 \mu\text{g}$, ne parvient pas à arrêter complètement la multiplication du staphylocoque, mais seulement à ralentir la montée de la courbe. D'autre part, l'auréomycine ajoutée seule à une culture bactérienne produit une courbe sensiblement identique à celle que l'on observe

en présence du mélange d'antibiotique et de bactériophage. Le ralentissement de la phase exponentielle de la croissance est d'autant plus prononcé que la concentration de l'antibiotique est plus élevée.

Si on ajoute d'abord l'antibiotique à la culture et ensuite le phage à des temps différents (fig. 2), la lyse phagique est d'autant plus retardée que les deux interventions sont plus rapprochées.

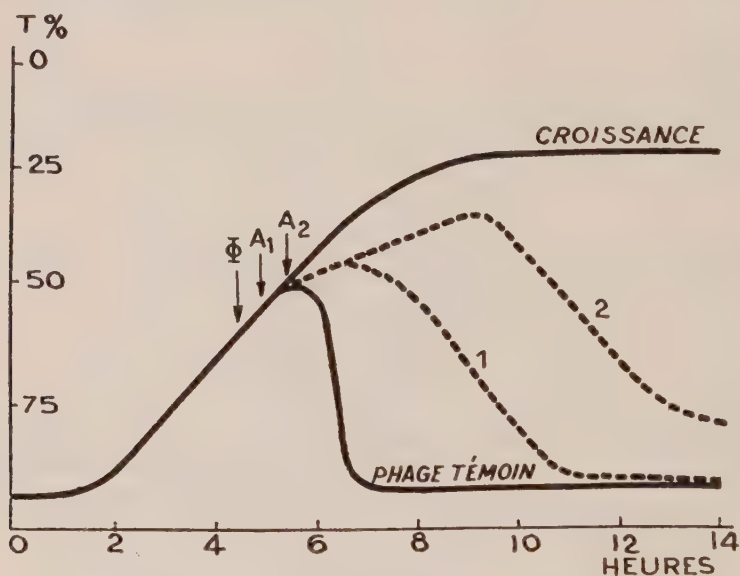


FIG. 3. — Action de l'auréomycine sur la culture staphylococcique préalablement infectée avec le phage Twort.

Les courbes « croissance » et « témoin bactériophage » montrent la croissance normale et la lyse normale, lorsque la dernière culture reçoit le phage au moment ϕ . Les courbes en pointillé correspondent aux cultures qui ont reçu, d'une part le phage et, d'autre part, 1 μ g d'auréomycine par centimètre cube, soit une demi-heure, (courbe 1), soit une heure (courbe 2) après le phage.

Au contraire, la vitesse de la lyse est plus grande si le phage est ajouté plus tardivement. Corollairement on constate que les vitesses de lyse sont voisines dans des cultures soumises au même instant à la même dose d'auréomycine (1 μ g par centimètre cube) quel que soit le moment de l'introduction du bactériophage.

Le retard de la lyse phagique par l'auréomycine est également manifeste si on ajoute au mélange bactérie-bactériophage l'antibiotique avant que la lyse ne se produise (fig. 3). Il est plus grand, si on ajoute l'auréomycine plus tardivement. Ainsi, si l'anti-

biotique est introduit juste avant le moment où l'éclaircissement commence à se manifester chez le témoin qui ne contient que la culture et le phage, la lyse n'est pas retardée seulement en comparaison avec le témoin, mais aussi en comparaison avec les cultures qui ont reçu l'antibiotique antérieurement.

DISCUSSION. — La première expérience montre que l'action de l'auréomycine sur la lyse phagique dépend de la concentration de cet antibiotique. Les concentrations comprises entre 0,5 et 2,5 μg par centimètre cube laissent encore la lyse évoluer mais la retardent, tandis que les doses supérieures suppriment tout éclaircissement de la culture. Dans la première série (doses moyennes) la lyse est retardée et ralentie. Le ralentissement augmente avec la dose. S'agit-il d'une action antilytique ? Cette hypothèse pourrait trouver un argument dans l'inhibition de la lyse avec des doses plus élevées d'antibiotique. Mais il est impossible de dire s'il s'agit d'une action antiphage, car on sait que l'antibiotique provoque un ralentissement de la culture bactérienne et qu'une croissance ralentie retarde aussi la lyse phagique. L'auréomycine, comme nous l'exposerons ailleurs, n'exerce aucune action directe sur le titre en corpuscules phagiques d'un lysat. Une telle absence d'activité a été aussi constatée par G. Barski et J. Maurin [10] pour les virus du groupe lymphogranulomatose-psittacose.

D'autre part, les deuxième et troisième séries d'expériences fournissent des résultats analogues : c'est pendant la période qui suit l'introduction de l'antibiotique que l'action antilytique de l'auréomycine est le plus prononcée. L'auréomycine subirait-elle une dégradation rapide, dégradation qui laisserait au bactériophage, par la suite, la possibilité d'exercer son action lytique ? Des recherches complémentaires dans le but d'élucider cette question sont nécessaires.

On pourrait envisager l'hypothèse d'une « accoutumance » des cellules bactériennes à l'auréomycine : après l'altération des processus nécessaires à la lyse par un premier contact avec l'antibiotique, la cellule acquerrait la capacité de surmonter l'obstacle élevé par l'antibiotique. La lyse pourrait ainsi se produire. L'auréomycine agirait donc comme une barrière temporaire dans le mécanisme de son déclenchement.

Mais si cette hypothèse, qui nous paraît assez peu vraisemblable, est écartée, une autre se présente à l'esprit : l'auréomycine et le processus de la lyse interviendraient l'un et l'autre dans des mécanismes du métabolisme de la cellule bactérienne. La lyse ne pourrait avoir lieu tant que l'auréomycine n'aurait pas été neutralisée par ce métabolisme encore inconnu. Il y aurait donc compétition entre l'antibiotique et le bactériophage.

L'action antilytique de l'auréomycine diffère assez sensiblement de celles de la pénicilline et de la streptomycine [1, 2, 3, 4]. Ces deux dernières substances inhibent la lyse en provoquant un arrêt de la croissance bactérienne. Si cette bactériostase est levée, soit par la pénicillinase, soit par l'apparition d'une culture streptomycino-résistante, la lyse survient. L'activité de l'auréomycine diffère aussi de celle de la chloromycétine qui entrave la multiplication des corpuscules bactériophagiques.

Résumé. — L'auréomycine, selon sa concentration, retarde ou inhibe la lyse bactériophagique. Le retard provoqué par des concentrations moyennes de l'antibiotique est d'autant plus faible que l'intervalle du temps écoulé entre l'addition du bactériophage et celle de l'antibiotique est plus grand.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. NICOLLE et M. FAGUET. *Ces Annales*, 1947, **73**, 490.
- [2] M. FAGUET et P. NICOLLE. *Ces Annales*, 1947, **73**, 1150.
- [3] M. FAGUET et E. EDLINGER. *Ces Annales*, 1949, **77**, 204.
- [4] E. EDLINGER et M. FAGUET. *Ces Annales*, 1950, **78**, 144.
- [5] M. FAGUET et E. EDLINGER. *Ces Annales*, 1950, **79**, 472.
- [6] E. EDLINGER et M. FAGUET. *Ces Annales*, 1950, **79**, 436.
- [7] M. FAGUET. *Act. Sci. et Ind.*, Hermann, Edit., Paris, 1941, 102 p.
- [8] P. NICOLLE et P. DUCREST. *Ces Annales*, 1947, **73**, 755.
- [9] M. AITOFF. *Ces Annales*, 1950, **79**, 222.
- [10] G. BARSKI et J. MAURIN. *Ces Annales*, 1950, **78**, 759.

LA FICHE RÉTICULO-ENDOTHÉLIALE

II. — LES CINQ TYPES PHYSIO-PATHOLOGIQUES

par G. SANDOR et J.-Ch. WEILL-FAGE (*).

(Institut Pasteur. Service de Chimie physique.)

Nous avons montré, dans un mémoire antérieur, que la solubilité des protéides sériques en fonction du pH, exprimée en taux de précipitation, est remarquablement constante chez l'homme normal et que, dès lors, les variations de cette solubilité caractérisent certains états pathologiques. Ces données, reflétant les divers états physio-pathologiques des systèmes producteurs du plasma sanguin, constituent la « fiche réticulo-endothéliale » d'un sujet [1].

Nos premiers travaux, rapportés dans ce mémoire, ne concernaient que 43 sérums de sujets normaux et de sujets pathologiques, ces derniers atteints d'affections diverses. Aussi, il ne pouvait s'agir que d'un premier coup de sonde jeté dans la pathologie générale. Pourtant, ces travaux nous avaient déjà permis de définir un syndrome d'hyperplasie, un syndrome d'aplasie et un troisième caractérisé par l'augmentation du taux d'une fraction globulinique particulière [1]. Depuis, nous avons pu étudier environ 60 nouveaux sérums de sujets malades, dont une quarantaine d'hépatiques (1). Or, nos recherches, ainsi considérablement élargies, ont confirmé, tout d'abord, les conclusions antérieures. D'autre part, nous pouvons maintenant interpréter rationnellement nos données en les rapportant à des fractions protéidiques dont l'existence se manifeste par des domaines de précipitation distincts sur nos courbes de solubilité. Enfin, nous pouvons ajouter deux syndromes physio-pathologiques nouveaux aux trois décrits antérieurement.

LES CINQ TYPES PHYSIO-PATHOLOGIQUES.

Dans une publication antérieure nous avons traité analytiquement nos courbes de solubilité et nous avons défini trois domaines

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 14 décembre 1950.

(1) La plupart de ces sérums proviennent du service du Dr Cattani à l'hôpital Tenon. Nous tenons à le remercier

de précipitation principaux. Nous avons appelé euglobulines I les protéides qui précipitent entre pH 7,7 et 6,6, euglobulines II ceux qui précipitent entre pH 6,6 et 6,2 à 6 et euglobulines III les protéides qui précipitent entre pH 6 et 5 [2]. Mais nous avons montré simultanément que les courbes sont, en fait, d'une plus grande complexité et qu'il y avait lieu de concevoir l'existence de toute une série de protéides distincts rentrant dans chacun des trois groupes principaux. Ceci, d'ailleurs, a été confirmé depuis par l'étude électrophorétique des fractions comparables contenues dans le sérum de cheval [3]. Nous allons montrer maintenant comment la médecine, admirable méthode de physiologie expérimentale, confirme ces données analytiques, attribuant à chaque fraction un rôle physio-pathologique particulier. Les résultats fournis par la pathologie générale confirment aussi ceux, purement immunochimiques, obtenus avec le sérum de cheval.

Rappelons que dans le sérum de cheval le groupe des euglobulines I, particulièrement labile, est le support principal des anticorps. A ses fractions les moins solubles s'attachent les précipitines-agglutinines et à ses composantes plus solubles les ambocepteurs [4]. C'est ce qui a motivé aussi, pour le sérum humain, la séparation d'une euglobuline particulièrement peu soluble du reste des euglobulines. Etant d'apparition première et appartenant au groupe I, nous l'avons appelée euglobuline I₁ [2]. Il a été montré déjà, dans le mémoire antérieur, que son taux sérique constitue une donnée physio-pathologique à part, très importante [4]. Confirmant la labilité du groupe des euglobulines I, groupe essentiellement immunologique dans le sérum de cheval, la plupart des modifications pathologiques le touchent aussi dans le sérum humain. Si les modifications du taux de l'euglobuline I₁ constituent un premier type physio-pathologique à part, les variations des autres euglobulines I permettent de définir deux autres types. Ce sont, d'une part, le type de blocage ou d'aplasie, lorsque toutes les euglobulines du groupe I, autres que l'euglobuline I₁, disparaissent, et le type d'hyperplasie ou de surfonctionnement lorsque le groupe des euglobulines I, euglobuline I₁ non comprise, s'enrichit. Ces faits ont été déjà présentés d'une autre manière dans notre premier mémoire [4]. Mais ce que nous ne savions pas encore alors, c'est la grande importance qui revient sur le plan pathologique aux euglobulines du groupe III. Rappelons qu'il s'agit de protéides contenant 18 à 20 p. 100 de substances lipoidiques, donc des vecteurs de graisses [3]. Aussi, comme il fallait s'y attendre, leur taux se modifie dans les troubles qui intéressent le métabolisme lipoidique. En particulier, ils disparaissent totalement dans la cirrhose du foie et dans certaines hépatites infectieuses qui, probablement, touchent profondément le parenchyme hépatique. Les euglobulines III tendent à dispa-

raître aussi dans le myxœdème. Dans les premiers cas nous avons un trouble du métabolisme des lipides, caractéristique de la dégénérescence parenchymateuse du foie, et dans le deuxième cas nous avons une hyperlipémie à cholestérol. Ceci paraît contradictoire puisque, malgré l'hyperlipémie, les euglobulines, vecteurs de graisses, disparaissent. Mais la contradiction n'est qu'apparente. En effet, les euglobulines représentent uniquement les fractions relativement peu solubles des protéides sériques [2]. Nous devons donc conclure que dans la dégénérescence parenchymateuse du foie et dans le myxœdème il n'existe dans le sérum que des lipo-protéides relativement solubles. Ce fait se confirme, d'ailleurs, aussi à l'examen macroscopique de ces sérums qui ne sont jamais laiteux. Et le quatrième groupe physio-pathologique, ainsi défini par la disparition des euglobulines III, admet admirablement son complément. En effet, dans l'hyperlipémie à graisses neutres, dont le type est la néphrose lipoïdique, les euglobulines III seules persistent. Donc, toutes les euglobulines, autres que l'euglobuline I_1 , sont des vecteurs de graisses. Nous avons, dès lors, une hyperlipémie à complexes lipo-protéïdiques insolubles. Et, effectivement, ces sérums sont toujours laiteux.

Dans la figure ci-après (fig. 1) nous avons reproduit les quatre types physio-pathologiques d'une manière purement analytique.

Du point de vue clinique, les fiches sont présentées par rapport aux données normales qui découpent une bandelette sur la surface (Eu./Eu. totales) $p. 100 \equiv (*) f(pH)$ [1]. Mais les données analytiques expliquent parfaitement les déplacements des diagrammes par rapport au normal.

Dans le blocage ou l'aplasie du mésenchyme les diagrammes se déplacent vers l'acidité [1]. Or ceci s'explique puisque les euglobulines I disparaissent et, dès lors, les proportions des euglobulines II et III augmentent. Rappelons que nous avons observé de tels diagrammes dans la phase terminale du mal de Bright, dans l'infarctus du myocarde, dans la phase invasive grave des maladies infectieuses [1]. Depuis, d'ailleurs, nous l'avons retrouvé chez certains cancéreux probablement en phase avancée.

Dans l'hyperplasie ou l'hyperfonctionnement du mésenchyme les diagrammes se déplacent vers l'alcalinité [1]. Effectivement, nous avons alors en taux relativement élevé une euglobuline à point isoélectrique particulièrement alcaline (euglobuline I_2 : fig. 1). Donc, proportionnellement, le groupe des euglobulines I augmente. Antérieurement déjà nous avons trouvé de tels dia-

(*) Les trois lignes parallèles horizontales superposées définissent un lien d'identité algébrique.

grammes « alcalinisés » chez des convalescents de fièvre typhoïde, chez un anémique avec plasmocytose, dans une glomérulonéphrite évolutive, dans un cas de saturnisme et dans une endocardite lente [1]. Mais les exemples extrêmes sont offerts par la plupart des cirrhoses du foie. Or, comme nous l'avons dit ci-dessus, dans les cirrhoses les euglobulines III disparaissent,

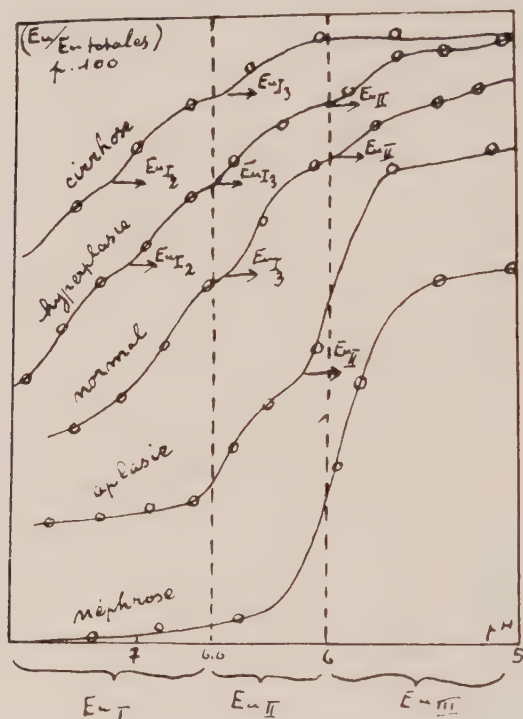


FIG. 1. — Les quatre syndromes. *Cirrhose* : disparition constante des euglobulines III; apparition très fréquente d'euglobulines I anormales. *Hyperplasie* : apparition d'euglobulines I anormales. *Aplasie* : disparition des euglobulines I. *Néphrose* : disparition des euglobulines I et II.

mais simultanément apparaissent en proportion élevée des euglobulines anormales du groupe I. Nous avons alors un type de diagramme cirrhotique très caractéristique ; la précipitation est déjà fortement avancée à pH 7,6 où nos diagrammes débutent [1] et elle est complètement terminée à pH 6 où commence la précipitation des euglobulines III (fig. 2). Un type exactement comparable est fourni par le myxoédème.

Conformément à notre conception, nous devons donc avoir dans

le myxœdème et la plupart des cirrhoses du foie une association entre deux processus physio-pathologiques distincts. L'un d'eux doit rendre compte de la disparition de l'euglobuline III et l'autre de l'apparition d'euglobulines I anormales. Nous avons déjà parlé du premier processus : mobilisation de phosphatides dans la dégénérescence du parenchyme hépatique et mobilisation du cholestérol dans le myxœdème. Quant au deuxième processus, il doit consister dans l'hyperplasie du tissu mésenchymateux. Ceci s'explique, tout d'abord, dans le myxœdème. En effet, au tarissement des sécrétions thyroïdiennes fait suite celui des sécrétions

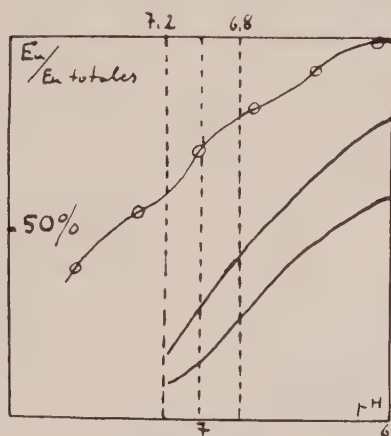


FIG. 2. — *Haen*. (Cirrhose du foie).
La bandelette limite les variations physiologiques.

thyrotrope et adrénotrope de l'hypophyse. Or, les sécrétions cortico-surréaliennes sous contrôle hypophysaire inhibent le développement du mésenchyme (2). Mais l'hyperplasie mésenchymateuse est un fait anatomo-pathologique connu aussi dans la plupart des cirrhoses. En effet, la dégénérescence parenchymateuse s'accompagne d'une hyperplasie compensatrice du tissu interstitiel qui, lui, évidemment, appartient au mésenchyme. Il est intéressant de constater à ce sujet combien le profil des protéides sériques est modifié dans les cirrhoses. Ce fait prouve que le tissu mésenchymateux du foie doit jouer un rôle prépondérant dans la synthèse du plasma.

Mais la disparition des euglobulines III seule caractérise

(2) La bibliographie concernant la question a été indiquée dans notre premier mémoire [1].

l'atteinte du parenchyme hépatique. Ainsi, nous avons eu quelques cas de cirrhose pour lesquels la précipitation débute normalement et ne se déplace vers la zone alcaline qu'au-dessous

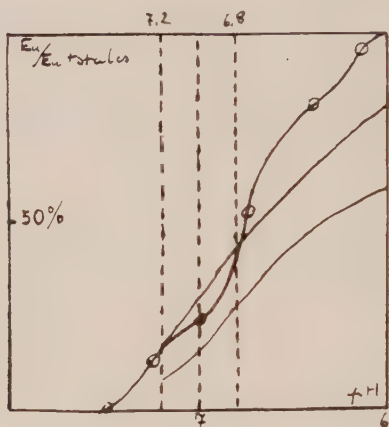


FIG. 3. — *Le.* (Cirrhose du foie).

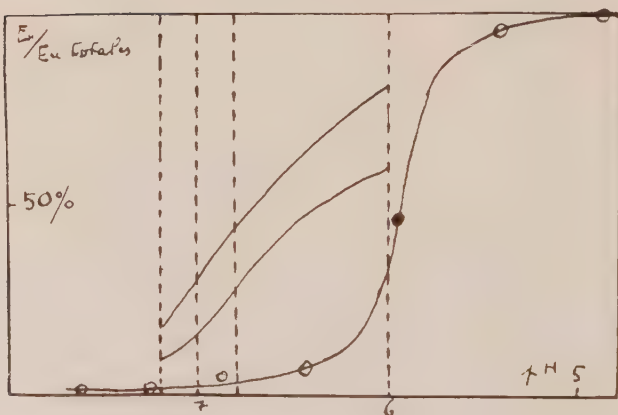


FIG. 4. — *Rev.* (Néphrose lipidique).

de pH 6,8 à 6,6. Nous en présentons un cas typique dans la figure 3. Les hépatites infectieuses graves en phase tardive entrent, en général, dans ce cas.

Enfin, dans la néphrose lipidique la précipitation ne commence qu'au-dessous de pH 6 (fig. 4). Or, il doit en être ainsi précisément si les euglobulines III seules existent dans le sérum.

Le cinquième type physio-pathologique est défini par l'augmentation du taux de l'euglobuline I_1 qui, normalement, ne dépasse jamais 0,7 p. 1 000 [4]. Nous avons montré, dans notre premier mémoire, que le lieu de synthèse sélectif de cette euglobuline est, probablement, le système kuppérien du foie. Nos recherches, depuis, ont confirmé intégralement le bien-fondé de ce point de vue. En effet, les taux extrêmes de l'euglobuline I_1 se rencontrent dans les cirrhoses où ils atteignent jusqu'à 3,8 p. 1 000. Dans les hépatites infectieuses leur taux peut également être très élevé. Mais, le taux de l'euglobuline I_1 n'augmente pas autant dans toutes les cirrhoses. Par contre, dans tous les cas où il y a lieu de supposer une infection hépatique concomitante (cirrhoses post-ictériques, cirrhoses avec ictère, cirrhoses fébriles), ce taux est très élevé. Donc la lignée mésenchymateuse qui synthétise cette fraction doit s'hyperplasier sélectivement dans les processus infectieux hépatiques. D'ailleurs, les infections intestinales (fièvre typhoïde, recto-colite, etc.), où l'immunisation est transportale, s'accompagnent d'une augmentation modérée, mais constante, du taux de cette fraction.

Nous avons encore trouvé le taux de cette fraction très élevé dans un cas de maladie de Vaquez (2 p. 1 000) et au cours d'une leucose aiguë aleucémique (1,6 p. 1 000). Peut-être s'agit-il ici d'une atteinte endothéliale primitive, faisant attribuer encore une fois l'euglobuline I_1 au système macrophagique endothélial et histiocyttaire. Par contre, chez un anémique avec plasmocytose à la ponction sternale et dans le myélome (où l'hyperplasie est principalement plasmocytaire), le taux de l'euglobuline I_1 est resté normal.

Dans le sens de l'intervention du système endothélial et histiocyttaire plaide aussi l'augmentation du taux de l'euglobuline I_1 dans les affections septiques subchroniques ou chroniques (arthrites rhumatoïdes, glomérulonéphrite évolutive, maladie d'Osler).

DISCUSSION.

Les discussions qui intéressent plus particulièrement la pathologie générale seront réservées aux journaux médicaux [5]. Nous tirerons, ici, les conclusions qui concernent la physiologie expérimentale.

Dans l'interprétation physiologique de nos données, tout dépend finalement de nos travaux de fractionnement chimique et de nos recherches immunologiques en cours. La remarquable constance de nos diagrammes à l'état normal, les limites très restreintes dans lesquelles varie à l'état physiologique le taux de l'euglobuline I_1 , posent le problème même de l'équilibre humoral. La proportion bien mesurée des diverses euglobulines est-elle

l'expression d'une régulation hormonale et nerveuse intéressant uniquement la composition des globulines relativement peu solubles ou exprime-t-elle à travers elles la composition des globulines sériques, en général ? Quoique, pour le moment, nous ne puissions rien dire de précis à ce sujet, *a priori* la deuxième alternative nous paraît plus probable. Il faudrait alors concevoir l'existence d'une régulation physiologique qui répartit les protéides sériques proportionnellement suivant leur solubilité.

D'ailleurs, la solubilité exprime la composition intime des protéides et à ce point de vue nous pouvons poser le problème d'une manière plus circonscrite. En effet, les syndromes de blocage ou d'hyperplasie proviennent, comme nous l'avons vu, de l'apparition ou de la disparition de protéides ayant des minimums de solubilité relativement très alcalins en présence de forces ioniques faibles. Or, dans ces conditions, les minimums de solubilité coïncident avec les points isoélectriques. D'ailleurs, expérimentalement nous avons déjà montré sur les fractions isolées que, par exemple, le point isoélectrique de l'euglobuline I_1 est le plus alcalin parmi toutes les euglobulines sériques [4]. Si nous rangeons les protéides sériques suivant leur solubilité par la méthode de relargage, nous obtenons une série où varient parallèlement la solubilité et les points isoélectriques. Les γ -globulines ont la solubilité la plus faible et le point isoélectrique le plus alcalin, et les albumines la solubilité la plus élevée et le point isoélectrique le plus acide [6, 7, 8]. Or, sur le plan chimique, ce qui est le plus net et connu de longue date, c'est la diminution du taux des amides primaires lorsqu'on passe des globulines aux albumines. Par contre, la composition en acides aminés reste sensiblement la même.

Dès lors, il serait tentant de faire rentrer l'albumine sérique dans la chaîne dont nous saisissons le bout euglobulinique, et de concevoir que tout l'ensemble des protéides sériques est fabriqué par le même système mésenchymateux. Les différentes lignées et les différents états physiologiques d'une même lignée de ce système se répartissent exactement *in vivo* comme les différents protéides humoraux qu'ils fabriquent. Seul varierait, somme toute, suivant les lignées et les états physiologiques, le degré d'amidification des restes d'acides glutamique et aspartique.

Cette hypothèse est facilement accessible au contrôle expérimental et si elle se révélait exacte, nous ferions un pas en avant dans la compréhension des mécanismes physiologiques d'aplasie et d'hyperplasie du mésenchyme. En effet, nous serions conduits à le chercher dans les processus de transamidation au sein des cellules mésenchymateuses.

Le cas de l'euglobuline I_1 est à part à tous les points de vue. Attribuable au système macrophagique, histiocytaire ou endo-

thélial, comme nous l'avons vu, l'augmentation de son taux pourrait exprimer ce que Ehrich [9] a appelé la maladie du mésenchyme. Il ne s'agit plus ni d'hyperplasie, ni de blocage, mais d'une mobilisation à prédominance histiocytaire qui est, en particulier, une réaction immunitaire déplacée. Au lieu d'un effet salutaire, ce type de réaction provoquerait en soi des lésions cardiovasculaires diffuses et des glomérulonéphrites [9]. Dans ce sens plaide l'augmentation du taux de l'euglobuline I₁ dans de nombreux cas d'arthrites rhumatoïdes, dans l'endocardite lente et dans la glomérulonéphrite évolutive. En effet, de nombreuses preuves plaident en faveur de l'hypothèse que ces états ne sont que des maladies primitives ou allergiques du mésenchyme [10].

BIBLIOGRAPHIE

- [1] G. SANDOR et WEILL-FAGE. *Ces Annales*, 1950, **79**, 130.
- [2] G. SANDOR et CEDDAHA. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, **31**, 1525.
- [3] G. SANDOR et DE MENDE. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1950, **32**, 550.
- [4] G. SANDOR et CEDDAHA. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, **31**, 1005.
- [5] G. SANDOR et WEILL-FAGE ; CATTAN, SANDOR et WEILL-FAGE. *Bull. et Mém. Soc. Méd. hôp.*, 1950, n^{os} 29-30.
- [6] TISÉLIUS. *Biochem. J.*, 1937, **31**, 313, 1464.
- [7] COHN, McMECKIN, ONCLEY, NEWEL et HUGHES. *Am. Chem. Soc.*, 1940, **62**, 3386.
- [8] SVENSSON. *J. biol. Chem.*, 1941, **139**, 805.
- [9] EHRLICH. *J. Am. Med. Assoc.*, 1947, **135**, 94.
- [10] Il nous est impossible de donner toutes les indications bibliographiques, très abondantes, qui concernent ces sujets. Nous en indiquerons simplement quelques-unes parmi les plus récentes : McKEOWN. *J. Path. a. Bact.*, 1947, **59**, 547 ; HAWN et JANNEWAY. *J. exp. Med.*, 1947, **85**, 171 ; EHRLICH, SEIFTER et FORMAN. *J. exp. Med.*, 1949, **89**, 23 ; MORE et WAUGH. *J. exp. Med.*, 1949, **89**, 541, 555 ; WISSLER, SMALL et LESH. *J. exp. Med.*, 1949, **90**, 577.

LES VACCINATIONS ANTIRABIQUES A L'INSTITUT PASTEUR EN 1949

par R. BÉQUIGNON et Ch. VIALAT.

Ce rapport, établi suivant le plan fixé par la Conférence internationale de la Rage, concerne l'année 1949.

1° Personnes traitées.

428 personnes se sont présentées à la consultation du service des vaccinations antirabiques. A 129 le traitement a été conseillé.

2° Méthode de traitement.

La méthode employée est la méthode pastorienne.

Les moelles sont soumises à la dessiccation, en chambre noire à 22°, dans des flacons munis de deux tubulures fermées par de l'ouate ordinaire et dont le fond est garni de potasse caustique. Après deux, trois ou quatre jours de dessiccation, les moelles sont introduites dans des pots-bans contenant 20 cm³ de glycérine neutre à 30° Baumé et stérilisés à l'autoclave à 120°.

Ce procédé de conservation des moelles en glycérine, proposé par E. Roux en 1887 [1] et introduit dans la pratique par A. Calmette en 1891, est adopté, depuis 1911, à l'Institut Pasteur.

Les moelles ainsi traitées sont conservées à la glacière à +3°.

Elles ne sont plus utilisées pour la vaccination lorsqu'elles ont séjourné dix à douze jours en glycérine.

Chaque jour, les sujets en traitement reçoivent 4 à 5 mm. de moelle desséchée et triturée dans 3 cm³ d'eau distillée stérile. Le traitement a une durée de quinze, dix-huit, vingt et un ou vingt-cinq jours, suivant la gravité des morsures.

*
* *

Le virus fixe actuellement utilisé représentait, le 31 décembre 1949, le 1826° passage de la souche isolée par Pasteur le 19 novembre 1882 et employée pour la vaccination, à partir du 90° passage, lors de la création du service de vaccination antirabique rue d'Ulm.

Afin d'éviter l'infection possible des moelles, celles-ci sont

extraites avant la mort des animaux, qui sont saignées dès que la paralysie est complète.

Le procédé d'extraction des moelles est celui décrit par Oshida.

★
★ ★

Formule du traitement d'après l'âge des moelles.

1 ^{er} jour	Moelle de 4 jours (3 cent. cubes).
2 ^e —	— 4 — —
3 ^e —	— 4 — —
4 ^e —	— 4 — —
5 ^e —	— 3 — —
6 ^e —	— 3 — —
7 ^e —	— 3 — —
8 ^e —	— 3 — —
9 ^e —	— 2 — —
10 ^e —	— 3 — —
11 ^e —	— 3 — —
12 ^e —	— 2 — —
13 ^e —	— 3 — —
14 ^e —	— 3 — —
15 ^e —	— 2 — —
16 ^e jour	Moelle de 3 jours (3 cent. cubes).
17 ^e —	— 3 — —
18 ^e —	— 2 — —
19 ^e jour	Moelle de 2 jours (3 cent. cubes).
20 ^e —	— 2 — —
21 ^e —	— 2 — —
22 ^e —	— 2 — —
23 ^e —	— 2 — —
24 ^e —	— 2 — —
25 ^e —	— 2 — —

3^o Répartition des personnes traitées d'après le territoire sur lequel elles ont été mordues :

Afrique	2
Allemagne	1
France	126

4^o Répartition des personnes traitées suivant l'animal mordeur.

Chiens de propriétaires connus	39
Chiens errants	70
Chats de propriétaires connus	10
Chats errants	9
Singe	1

5^o Répartition des personnes traitées d'après les preuves de rage chez l'animal mordeur.

Catégorie A. — La rage de l'animal mordeur a été constatée par le développement de la maladie chez des animaux inoculés avec le cerveau ou par un examen histologique.

Catégorie B. — La rage de l'animal mordeur a été constatée par examen vétérinaire.

Catégorie C. — L'animal mordeur est suspect de rage.

Catégorie A (examen effectué à Alfort)	1
Catégorie B.	0
Catégorie C	128

Les névraxes de 86 animaux ont été examinés par le service des vaccinations antirabiques. Vingt-huit fois les commémoratifs de la morsure de l'animal et l'examen histologique du système nerveux nous ont autorisés à arrêter le traitement chez les personnes mordues.

Les principes généraux qui ont dicté cette décision ont été rappelés dans un rapport précédent [2].

Au cours de ces examens il nous a été donné d'isoler une souche de rage des rues en provenance de Corse (3 personnes avaient été mordues qui ont été traitées sur place et ne figurent pas dans la statistique).

6° Répartition des personnes traitées d'après les caractères de la morsure :

Profondes	99
Superficielles	30

7° Répartition des personnes traitées suivant que les vêtements ont été interposés ou non :

Peau nue	103
Vêtements interposés	26

8° Répartition des personnes traitées d'après le siège de la morsure () :*

Tête.	10
Membres supérieurs.	70
Tronc.	3
Membres inférieurs	46

9° Répartition des personnes traitées d'après le nombre de jours écoulés entre la morsure et le traitement :

0 à 4 jours.	80
5 à 7 jours.	21
8 à 14 jours.	11
15 à 21 jours	8
Plus de 21 jours.	9

(*) Quand il s'agit de morsures multiples, seul est indiqué le siège de la morsure la plus dangereuse.

10° *Autres renseignements :*

Répartition des personnes traitées par départements :

Aisne	2	Loiret	3
Allier	2	Maine-et-Loire	3
Aube	1	Meuse	1
Calvados	2	Moselle	1
Cher	1	Oise	2
Côtes-du-Nord	2	Pyrénées (Basses-)	1
Côte-d'Or	1	Rhin (Bas-)	2
Creuse	2	Sarthe	1
Eure-et-Loir	1	Seine { Paris	38
Finistère	2	Banlieue	29
Indre	2	Seine-et-Marne	1
Landes	1	Seine-et-Oise	17
Loire (Haute-)	1	Seine-Inférieure	2
Loir-et-Cher	2	Yonne	2
Loire-Inférieure	1		

Le tableau ci-dessous indique les résultats généraux des vaccinations depuis l'origine.

ANNÉES	PERSONNES traitées	CATÉGORIE A	CATÉGORIE B	CATÉGORIE C	DÉCÈS	MORTALITÉ p. 100
1886	2 671	231	1 926	514	25	0,94
1887	1 770	357	1 156	257	14	0,79
1888	1 622	402	972	255	9	0,55
1889	1 830	346	1 187	297	7	0,38
1890	1 540	416	900	215	5	0,32
1891	1 559	324	915	320	4	0,25
1892	1 790	128	1 062	600	4	0,22
1893	1 648	132	1 008	508	6	0,36
1894	1 384	166	798	423	7	0,50
1895	1 520	122	949	449	5	0,38
1896	1 308	106	747	455	4	0,30
1897	1 529	150	918	461	6	0,39
1898	1 465	141	855	469	3	0,20
1899	1 614	152	1 099	363	4	0,25
1900	1 420	179	866	375	4	0,28
1901	1 321	174	785	362	5	0,38
1902	1 105	150	625	330	2	0,18
1903	628	116	224	288	2	0,32
1904	755	148	330	277	3	0,39
1905	727	166	306	255	3	0,41
1906	772	173	396	203	1	0,13
1907	786	135	384	267	3	0,38
1908	524	113	269	142	1	0,19
1909	467	84	210	173	1	0,21
1910	401	98	143	160	0	0,00
1911	342	76	114	152	1	0,29
1912	395	71	145	179	0	0,00
1913	330	73	113	144	0	0,00
1914	373	68	102	203	0	0,00
1915	654	87	301	266	1	0,15
1916	1 388	188	658	542	3	0,21
1917	1 543	216	848	479	4	0,26

ANNÉES	PERSONNES traitées	CATÉGORIE A	CATÉGORIE B	CATÉGORIE C	DÉCÈS	MORTALITÉ p. 100
1918	1.803	206	885	712	3	0,16
1919	1.813	231	920	662	3	0,16
1920	1.126	86	554	486	6	0,53
1921	998	64	412	522	1	0,10
1922	754	101	353	300	0	0,00
1923	727	90	363	274	0	0,14
1924	764	135	208	421	1	0,00
1925	782	110	316	356	0	0,00
1926	634	74	246	314	0	0,00
1927	639	78	281	280	0	0,00
1928	671	76	203	387	0	0,00
1929	542	49	231	262	0	0,00
1930	589	77	116	396	0	0,00
1931	531	49	212	270	0	0,00
1932	561	64	271	226	0	0,00
1933	443	41	122	280	0	0,00
1934	496	23	51	422	0	0,00
1935	510	18	42	450	0	0,00
1936	463	13	20	430	0	0,00
1937	454	2	18	434	0	0,00
1938	411	3	11	397	0	0,00
1939	411	2	14	395	0	0,00
1940	449	0	8	441	0	0,00
1941	214	1	0	213	0	0,00
1942	149	0	1	148	0	0,00
1943	131	0	0	131	0	0,00
1944	122	0	1	121	0	0,00
1945	179	0	2	177	0	0,00
1946	228	1	1	226	0	0,00
1947	212	1	3	208	0	0,00
1948	150	1	1	148	0	0,00
1949	129	1	0	128	0	0,00
Total général.	55.269	7.085	27.191	20.993	151	0,27

*
* *

Le service antirabique a, en outre, fabriqué en 1949 :

14 litres de vaccin antirabique phéniqué à usage humain et
34 litres de vaccin à usage vétérinaire.

11° *Mesures prises en vue de suivre l'évolution des cas traités pendant six mois au maximum.*

Les médecins sont priés de nous tenir au courant des accidents qui pourraient se produire pendant les six mois qui suivent le traitement.

12° *Accidents paralytiques* : Néant.

13° *Décès* : Néant.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Roux (E.). *Ces Annales*, 1887, 1, 87.

[2] BÉQUIGNON (R.) et VIALAT (Ch.). *Ces Annales*, 1943, 69, 372

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15°.*)

Séance du 11 Janvier 1951.

Présidence de M. LEMOIGNE.

NÉCROLOGIE

RENÉ LEGROUX

(1877-1951)

Au moment où nous entrons en séance, nous apprenons avec douleur la nouvelle de la mort du professeur René Legroux.

Ce n'est pas devant cette Société dont il a été l'un des fondateurs, dans cette maison où il a pendant tant d'années joué un rôle essentiel, qu'il sera nécessaire de souligner l'immensité de la perte. Tous les pasteurien d'aujourd'hui ont été ses élèves, et il en est bien peu qui n'aient eu l'occasion de contracter envers lui une dette de reconnaissance personnelle. Successeur de M. Roux à la Direction du Cours dont il a maintenu la tradition et étendu l'enseignement, année après année, René Legroux a formé des promotions de bactériologistes et de chercheurs dont il est bien souvent par la suite resté le maître et le conseiller.

Nul ne possédait mieux que lui la technique bactériologique, ne connaissait mieux le caractère, la vie et le devenir des espèces microbiennes, et ce n'est jamais en vain que l'on faisait appel à ses connaissances encyclopédiques en microbiologie, à son inépuisable obligeance, que ce fût pour identifier un microbe, pour se documenter sur une méthode ou pour préciser un détail historique de l'épopée pasteurienne à laquelle il avait voué un culte passionné.

Nous ne pouvons oublier non plus le rôle essentiel qu'il a joué au cours de la guerre 1914-1918, dans la création et l'organisation des laboratoires d'armée, ni les missions qu'il a à plusieurs reprises remplies à l'étranger, notamment à Téhéran où, séjournant à l'Institut Pasteur de l'Iran, il a subi les premières atteintes du mal qui devait finalement l'emporter.

Il serait impossible de retracer en quelques mots la carrière et l'œuvre de René Legroux. Le Comité de Rédaction consacrera à René Legroux, dans nos *Annales*, l'hommage qu'il mérite.

Tous ceux qui ont été ses élèves, ses collaborateurs, et parfois ses amis, sauront lui garder un fidèle et reconnaissant souvenir.

P. LÉPINE.

MAURICE LANGERON

(1874-1950)

Notre Compagnie perd dans la personne de Maurice Langeron un mycologiste médical et un microscopiste de haute valeur.

Langeron était né à Dijon, le 3 janvier 1874 ; il prit son grade de docteur en médecine en 1902, reçut sa formation de naturaliste au Muséum d'Histoire Naturelle, et celle de parasitologiste au laboratoire de Raphaël Blanchard à la Faculté de Médecine de Paris.

Directeur de recherches au Centre National de la Recherche Scientifique, directeur de laboratoire à l'Ecole des Hautes-Etudes, chef des travaux de Parasitologie à la Faculté de Médecine de Paris, Langeron était un savant, d'une vaste érudition, d'une intelligence claire et coordinatrice et d'une grande indépendance de caractère. Il associait à une rigueur technique et au pragmatisme qui est l'une des marques de l'Ecole d'Emile Brumpt l'imagination et l'intuition qui construisent l'hypothèse de travail. Il libérait parfois, dans le cadre ascétique de son laboratoire, une fantaisie cocasse et explosive imprégnée de la verdure de son terroir natal.

Expérimentateur exigeant, ingénieux et adroit, il excellait à confronter les techniques et à dégager celles qu'il jugeait essentielles. Il abordait les problèmes avec ce non-conformisme qui est le propre du chercheur scientifique ; c'est ainsi qu'il n'hésita pas à considérer que les champignons ne sont pas des végétaux, mais des Protistes, opinion qui a été admise par des mycologues éminents.

Doué d'un sens didactique remarquable, mais atteint de polysyllabie, Langeron ne put faire une carrière professorale à la Faculté de Médecine, mais il enseigna supérieurement par ses commentaires, son exemple et ses livres.

Les travaux les plus marquants de Langeron portent sur la Mycologie générale et médicale et sur les techniques microbiologiques et parasitologiques. En Mycologie, Langeron classa et coordonna les caractères des organes reproducteurs et propagateurs ; il reprit la systématique des champignons pathogènes pour l'homme et, se fondant sur des données morphologiques et biologiques, il ramena de 746 à 42 les espèces décrites ; il étudia la filamentation des champignons levuriformes, les reliant ainsi aux formes mycéliennes ; il apporta une contribution importante à l'identification des Teignes. Ses travaux de mycologie ont été publiés dans les *Bulletins de la Société de Pathologie exotique*, dans les *Annales de Parasitologie* et dans son ouvrage

magistral, le « Précis de Mycologie générale et médicale », édité par Masson, en 1945.

On peut écrire que toutes les techniques microscopiques et parasitologiques ont été contrôlées et, éventuellement, révisées par Langeron ; gigantesque travail qui occupa une grande partie de sa vie et qui nous apporta son « Précis de microscopie ». Cet ouvrage complet, clair, pratique et d'une documentation impeccable, est présentement le livre de base des travailleurs de laboratoire ; il a connu 7 éditions.

On doit encore à Langeron un petit précis de Coprologie microscopique qu'il publia avec Rondeau du Noyer et qui est un excellent guide de prospection des selles.

Puisque nous parlons ici dans l'enceinte de l'Institut Pasteur, nous rappellerons que Langeron fut chargé de mission par l'Institut Pasteur de Tunis et par l'Institut Pasteur du Maroc, dans le but de prospecter les Mycoses et l'épidémiologie du paludisme sur leurs territoires.

Il faut se représenter avec quelle persévérance et quelle volonté d'être utile, clair et complet, Langeron, laissant là les préséances, les ambitions et les succès faciles, a écrit ses ouvrages didactiques. Ce ne sont pas seulement ses collaborateurs, ses élèves et ceux qu'il conseilla avec une affabilité, parfois malicieuse, mais inlassable, qui ont contracté envers Langeron une dette de reconnaissance, mais aussi tous ceux pour lesquels ses précis ont été décrits.

R. DESCHIENS.

COSTANTINO GORINI

(1865-1950)

J'ai le regret d'annoncer la mort du professeur Costantino Gorini, professeur de Bactériologie agricole à l'Université de Milan. Correspondant de l'Académie des Sciences et Membre de l'Association des Microbiologistes de Langue Française, dont il a été l'un des premiers membres étrangers. Le professeur Costantino Gorini, savant intègre, modeste et travailleur acharné, laisse une œuvre scientifique importante consacrée en majeure partie à la bactériologie agricole et à celle des produits laitiers. Il jouissait, dans son pays comme à l'étranger, d'une haute réputation. Bactériologiste de grande classe, formé à l'école pasteurienne, Gorini, qui parlait parfaitement notre langue, faisait en France de fréquents séjours et ne manquait jamais une occasion de manifester sa sympathie pour notre pays. Son esprit libéral et son attitude indépendante lui valurent la suspicion du régime fasciste ; mais les événements devaient se charger de rendre justice au professeur Gorini qui s'est éteint entouré de l'estime générale.

Nous adressons à sa famille l'expression de nos vives condoléances.

P. LÉPINE.

PRÉSENTATION D'OUVRAGES

M. Hauduroy : J'ai l'honneur d'offrir à notre Société un ouvrage que vient de publier le Centre de Collections de Types microbiens que je dirige à Lausanne : *Techniques bactériologiques* (1). On y trouvera réunies les principales techniques bactériologiques utilisées dans les Collections pour l'isolement, la détermination et la conservation des microorganismes.

Il s'agit là d'une œuvre commune qui n'a pu être menée à bien que grâce à l'amicale bonne volonté d'un certain nombre de nos collègues que je tiens à remercier ici.

Il ne s'agit aussi que d'un essai. Cet ouvrage sera, je l'espère, le point de départ d'une œuvre beaucoup plus vaste et plus importante de compréhension et de coordination internationale.

Les techniques ne sont-elles pas à la base de tous nos travaux ? Et si nous désirons publier des œuvres vérifiables ou vérifier des œuvres publiées, ne sommes-nous pas dans l'obligation absolue de dire avec la plus grande précision possible comment nous avons opéré ou de suivre à la lettre les procédés de nos collègues ?

Cette vérité est, hélas ! trop souvent oubliée. J'espère que l'ouvrage *Techniques bactériologiques* permettra, dans une certaine mesure, à tous les travailleurs d'obtenir des résultats comparables. Je n'aurais garde d'oublier l'Académie suisse des Sciences médicales et l'UNESCO, dont l'appui constant nous a permis de mener à bien ce travail.

M. Prévot : J'ai l'honneur de présenter à la Société française de Microbiologie l'ouvrage du professeur Onorato VERONA : *Microbiologia delle Fermentazioni e Microbiologia Industriale* (1).

Ce très beau volume, richement illustré (385 figures), vient combler une lacune regrettable de la microbiologie des pays latins : celle des fermentations et de l'industrie. Après une première partie très importante traitant des généralités (historique ; Schizomycètes ; levures ; Eumycètes ; enzymes, techniques générales), la seconde partie expose la microbiologie et la biochimie des fermentations (protéolyse, glucidolyse ; pectinolyse, glucosidolyse ; fermentations alcooliques ; fermentations anaérobies ; fermentations aérobies ; destruction microbienne des hydrocarbures, des acides, des alcools et des lipides ; oxydation et réduction des substances minérales). La troisième partie est constituée par la microbiologie industrielle (eaux potables et industrielles ; eaux usées ; méthane, éthanol ; bière ; levures ; amylolyse ; glycérine ; vinaigre ; panification ; lait ; beurre ; fromages ; rouissage ; sucrerie ; pâtes à

(1) P. HAUDUROY, *Techniques bactériologiques, utilisées pour l'isolement, la détermination et la conservation des microorganismes (bactéries, champignons microscopiques, virus)*. Masson et C^{ie}, Paris, 1951, 167 pages, 24,5×17 cm. Prix : 650 fr.

(1) O. VERONA, *Microbiologia delle fermentazioni e microbiologia industriale*. Firenze, Luigi Macri, 1950, 1 022 pages. Prix : 8 000 l.

papier ; conservation des produits naturels). Index bibliographique très complet. A côté de nombreuses qualités très solides, ce traité pêche par une nomenclature désuète, mais tel qu'il est, il rendra service à tous les microbiologistes des industries de fermentation, pour lesquels il n'existait pas de traité moderne. Il rendra aussi service aux chercheurs de laboratoire par le développement biochimique du mécanisme de chaque fermentation.

M. Lépine : J'ai l'honneur de présenter à la Société l'ouvrage de M. R. CHAUSSINAND : *La Lèpre* (1).

La compétence, l'expérience clinique de R. Chaussinand et sa grande érudition le désignaient particulièrement pour écrire ce livre où il étudie de façon compréhensive et détaillée l'étiologie, la clinique, le diagnostic, la prophylaxie et le traitement de la lèpre. Le texte en est agréable à lire et d'une minutieuse précision, les illustrations particulièrement abondantes sont d'une qualité graphique et documentaire exceptionnelle. Les techniques microscopiques essentielles au diagnostic sont rappelées dans un court appendice. Une bibliographie sommaire des travaux à consulter complète l'ouvrage qui, quoique concis, est le plus complet et le plus moderne qui puisse être mis à la disposition des cliniciens.

On ne peut que souhaiter à ce volume si sympathique la très large diffusion qu'il mérite.

COMMUNICATIONS

ÉTUDE MORPHOLOGIQUE AU MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE DES PARTICULES SUBMICROSCOPIQUES D'AMIANTE CONTENUES DANS L'AIR (1)

par P. LÉPINE et O. CROISSANT.

(Service des Virus, Institut de Microbiologie et d'Hygiène
de l'Université de Montréal et Institut Pasteur, Paris.)

Si les accidents produits par l'inhalation de particules d'amiante (asbestose) ont entraîné une masse considérable de travaux, l'étude au microscope électronique de particules submicroscopiques d'amiante n'a, à notre connaissance, donné lieu qu'à peu de recherches.

Les premiers, Friess et Muller [1] ont constaté, en 1939, que l'épais-

(1) R. CHAUSSINAND, *La Lèpre*. L'Expansion Scientifique Française, éditeur, 1950, 212 pages, 21,5 x 14 cm.

(1) Recherches exécutées avec une subvention des Ministères de la Santé de la Province de Québec et du Gouvernement Fédéral du Canada.

seur des aiguilles d'amiante rencontrées dans les poussières industrielles et retenues par les cartouches filtrantes des masques était de 20 à 120 $m\mu$.

En 1941, F. Kühn [2] a consacré un travail important à l'étude de l'amiante amorphe, ou serpentine (chrysotil), et de l'amiante cristalline (amosit), en partant d'échantillons de ces différentes substances, en particulier d'amiante de l'Afrique du Sud. Il a analysé au microscope électronique les poussières retenues par les masques de protection et procédé à l'examen, après calcination ou traitement chimique, des cendres de tissu pulmonaire chez trois sujets ayant succombé après atteinte d'asbestose. Il conclut que l'amiante cristalline se présente sous forme d'aiguilles de 15 à 50 $m\mu$ de diamètre, généralement réunies en gros paquets. Dans les poussières des masques, ces aiguilles sont associées à des débris d'origines diverses. Dans les poumons des malades, on trouve des aiguilles ayant un diamètre de 6 à 15 $m\mu$, plus ou moins enrobées et modifiées. La serpentine ne paraît pas être responsable des lésions constatées dans les tissus.

En 1943, Ruska [3] a repris, sur les poumons de sujets ayant succombé à l'asbestose, l'étude de Kühn dont il a confirmé les conclusions en montrant l'absence de serpentine dans le tissu pulmonaire, et la présence exclusive d'aiguilles à structure cristalline dont il a démontré la nature chimique par l'étude des diagrammes de diffraction des électrons.

Nous n'avons eu connaissance des travaux rappelés ci-dessus qu'après des recherches entreprises à Montréal à la demande de M. S. Plamondon, du Ministère de la Santé de la Province de Québec, qui nous a remis, pour analyse, 6 échantillons d'air filtré recueillis dans des locaux industriels de la Province de Québec où sont traités les minerais d'amiante de la production locale.

Les particules en suspension dans l'air ont été précipitées par barbotage dans l'éthanol et concentrées par l'évaporation des échantillons, puis centrifugation lorsque le volume originel a été réduit à environ 20 cm^3 . Après décantation, le culot invisible a été remis en suspension dans l'eau distillée et déposé sous forme de microgouttes à la surface de grilles recouvertes d'une membrane de collodion. Les préparations ont été ombrées par évaporation oblique de palladium et examinées au microscope électronique (microscope R.C.A.).

Dans ces conditions, on observe la présence, par ordre de fréquence relative :

1° D'aiguilles cristallines dont la structure est analogue, à l'échelle près, aux échantillons d'amiante cristalline examinés au microscope optique. Ces aiguilles représentent environ 65 à 75 p. 100 des particules rencontrées (hors-texte, fig. 1, 2, 3, 4).

2° Des particules amorphes, opaques, à contours irréguliers plus ou moins arrondis, ayant, toutes proportions gardées, l'aspect des particules de serpentine. Ces particules représentent environ 35 p. 100 des particules rencontrées (fig. 1 du texte).

3° Enfin, une faible proportion de particules de très petite taille, échappant à toute description, représente vraisemblablement des débris d'origines diverses sans relation avec le matériel examiné.

Ce sont évidemment les éléments à structure cristalline qui présen-

tent le plus grand intérêt, non seulement en raison de leur fréquence dominante, mais surtout à cause de la forme qui rend vraisemblable leur pénétration dans les tissus.

Ils se présentent sous forme d'aiguilles acérées d'un diamètre constant sur tous les échantillons, de $28 \text{ m}\mu$, rassemblées en faisceaux épais dont le diamètre peut atteindre $0,85 \mu$ pour une longueur de plusieurs μ . L'extrémité de ces faisceaux en montre nettement la division en aiguilles élémentaires, lesquelles se présentent, d'autre part, en assez grand nombre à l'état isolé en fragments allant de $0,05 \mu$ pour les

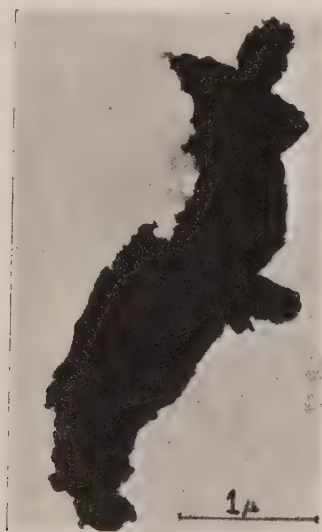


FIG. 1. — Fragment de serpentine recueilli dans l'air filtré (microscope RCA, grossissement réduit à 12 000).

plus courts à $2,5 \mu$ pour les plus longs, les longueurs les plus fréquemment rencontrées étant de $0,75$ à $1,50 \mu$. Des fragments de serpentine sont parfois associés soit aux faisceaux d'aiguilles, soit aux aiguilles individuelles. La relative transparence des aiguilles aux électrons permet de reconnaître nettement dans celles d'apparence plus large la superposition de deux ou plusieurs systèmes individuels.

Les aspects observés ont été qualitativement les mêmes dans les six échantillons soumis à notre examen. N'ayant pas effectué nous-mêmes les prélèvements d'air, nous n'en tirons aucune déduction quantitative quant à leur teneur relative des différents échantillons en particules submicroscopiques.

Nos recherches confirment donc l'aspect au microscope électronique des éléments cristallins et des éléments amorphes de l'amiante. Dans le cas des minerais canadiens examinés, les aiguilles cristallines présen-

tent une remarquable constance de structure et de largeur pour des éléments dont la longueur individuelle est variable.

Des formations analogues, mais de structure plus irrégulière, ont été reconnues par les auteurs allemands à l'examen direct d'échantillons minéraux et dans des produits susceptibles de déterminer l'asbestose pulmonaire (cartouches filtrantes des masques ou tissu pulmonaire lésé).

Nos constatations démontrent, en outre, la présence de particules soit du même ordre de grandeur, soit d'une taille totalement infra-microscopique dans des échantillons d'air prélevé dans des locaux industriels et qui, précédemment examinés par les méthodes ordinaires, n'avaient pas révélé la présence de produits suspects.

La taille des particules examinées et leur formation aciculée rendent vraisemblables leur phagocytose dans l'organisme et la formation de lésions tissulaires par les mécanismes déjà reconnus pour être à l'origine des lésions d'asbestose dans le cas des particules d'ordre microscopique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] H. FRIESS et H. D. MULLER. *Gasmasker*, 1939, **2**, 1 [cité par Kühn ; nous n'avons pu consulter cette publication].
- [2] J. KÜHN. *Arch. Gew. Path. Gew. Hyg.*, 1941, **40**, 473-485.
- [3] H. RUSKA, *Arch. Gew. Path. Gew. Hyg.*, 1943, **44**, 575-578.

PLANCHE

Amiante cristalline dans l'air :

- 1. — Amiante cristalline,
faisceau d'aiguilles d'où se détachent à gauche trois aiguilles isolées.
- 2. — Aiguilles cristallines d'amiante avec un fragment de serpentine.
- 3. — Paquet d'aiguilles cristallines.
- 4. — Fragment de serpentine d'où émerge un faisceau d'aiguilles.

Sur les figures 2, 3 et 4 on remarque la transparence des aiguilles cristallines aux électrons et la superposition de plusieurs systèmes cristallins correspondant aux aiguilles élargies. (*Institut de Microbiologie et d'Hygiène de l'Université de Montréal, Service des Virus. Microscope RCA. Clichés réduits pour la reproduction à un grossissement de 16 400.*)



INFLUENCE DE L'INJECTION DE SÉRUM SPÉCIFIQUE SUR L'IMMUNITÉ CONFÉRÉE PAR L'INOCULATION DE CULTURES ATTÉNUÉES

par A. STAUB et B. VIRAT.

(Institut Pasteur.)

On sait que l'inoculation simultanée d'un sérum spécifique et de la culture microbienne correspondante permet, dans certains cas, d'immuniser activement les animaux contre la maladie dont ce microbe est l'agent. Mais, pour que la vaccination soit efficace, il est nécessaire d'utiliser une culture virulente, ce qui suppose l'emploi d'un sérum très actif. C'est le cas, par exemple, de la séro-vaccination contre le Rouget du porc et, pour les maladies à virus, de celle, quoique avec quelques réserves, contre la Peste porcine.

Si, au contraire, l'activité du sérum est moindre, on ne saurait envisager sans risque ce mode d'immunisation. Sobernheim avait tenté de supprimer ce risque en utilisant, concurremment avec le sérum anti-charbonneux, une culture atténuée de bactériidie ; son procédé fut promptement abandonné en raison des nombreux succès de vaccination.

Nous avons voulu nous rendre compte *expérimentalement* de l'action empêchante du sérum spécifique dans la vaccination par cultures atténuées. Nous avons choisi, pour ce faire, deux maladies, le Rouget et le Charbon bactériidien, contre chacune desquelles nous possédons un vaccin qui, quoique inoffensif, même pour les animaux de laboratoire, est sûrement efficace, et un sérum, très puissant pour le Rouget, de bonne activité pour le Charbon (1).

ROUGET. — Animal d'expérience : pigeon.

Les pigeons ont reçu le sérum (2 cm³) à des temps variables avant le vaccin (1/4 cm³) dans les muscles pour les deux produits, mais de part et d'autre du bréchet. Ils ont été éprouvés par une culture virulente dix-sept jours après l'inoculation du vaccin. Comme contrôle d'immunité passive, la même quantité de sérum (2 cm³) est injectée à une autre série de pigeons qui sont éprouvés après des temps variables par une culture virulente et dont les survivants sont réinoculés en même temps et avec la même culture virulente que les pigeons sérum-vaccin (tableau I).

(1) Le vaccin en question contre le Rouget (vaccin vivant U. R.) a permis depuis une dizaine d'années de remplacer la séro-vaccination, comme il ressort des 420 000 vaccinations effectuées en 1949 et 1950 avec ce vaccin.

TABLEAU I.

ESSAI SÉRUM-VACCIN			ESSAI SÉRUM-VIRUS			
Numéros des pigeons	Intervalle entre sérum et vaccin en jours	Epreuve virulente 17 jours après le vaccin. Résultats	Numéros des pigeons	Intervalle entre sérum et virus en jours	Résultats	Epreuve virulente 17 jours après le virus. Résultats
1	0	+ 3	17	0	S	+ 3
2	0	+ 3	18	0	S	S
3	2	+ 2 1/2	19	1	S	+ 4
4	2	+ 3	20	1	S	S
5	3	+ 4	21	2	S	S
6	3	+ 4 1/2	22	2	S	S
7	6	+ 3 1/2	23	6	+ 3 1/2	S
8	6	S	24	6	+ 6	S
9	8	S	25	Virus sans sérum.	+ 2 1 2	S
10	8	S	26	Id.	+ 2 1 2	S
11	10	S	27	Ni sérum, ni virus.	+ 2 1 2	+ 2 1 2
12	10	S	28	Id.		+ 3
13	Vaccin sans sérum.	S				
14	Id.	S				
15	Ni vaccin, ni sérum.	+ 2 1/2				
16	Id.	+ 3				

+ 3, mort en trois jours; S, survie. A noter la mort des pigeons 17 et 19 qui n'ont pas bénéficié de la sérovaccination.

Nous voyons que l'effet du vaccin, inoculé dans les cinq jours qui suivent l'injection de sérum, est complètement annihilé. Le sixième jour paraît être le terme limite où l'action empêchante du sérum commence à disparaître. C'est également vers le cinquième ou le sixième jour que l'immunité passive conférée par le sérum contre une inoculation virulente fléchit.

CHARBON. — Animal d'expérience : lapin.

Le sérum (3 cm³) et le vaccin (1/4 cm³) sont inoculés sous la peau respectivement à chacune des cuisses (tableau II).

Ici la période d'inhibition du sérum n'est que de trois jours, sans doute en rapport avec l'activité moindre du sérum anti-charbonneux comparativement à celle du sérum anti-rouget, qu'on sait être le plus puissant sérum antimicrobien connu, conjointement avec l'efficacité du vaccin utilisé qui, quoique n'entraînant jamais la mort des cobayes ou des lapins, protège, après une seule inoculation, les premiers pour les 4/5, les seconds pour la totalité contre 500 à 1 000 doses mortelles de spores charbonneuses pleinement virulentes.

TABLEAU II.

ESSAI SÉRUM-VACCIN			CONTROLE SÉRUM		
Numéros des lapins	Intervalle entre sérum et vaccin en jours	Epreuve virulente 14 jours après le vaccin. Résultats	Numéros des lapins	Quantité de sérum injectée en cm ³	Epreuve virulente 24 heures après le sérum. Résultats
1	0	+ 2 1/2	13	1	+ 6
2	0	+ 3 1/2	14	2	+ 3
3	2	+ 3 1/2	15	3	S
4	3	+ 7	16	5	S
5	4	S	17	0	+ 4
6	4	S			
7	6	S			
8	6	S			
9	Vaccin sans sérum.	S			
10	Id.	S			
11	Ni vaccin ni sérum.	+ 3			
12	Id.	+ 3 1/2			

CONCLUSIONS. — Lorsqu'un sérum spécifique a été administré préventivement à des animaux, il ne faut pas procéder à leur vaccination par culture atténuée avant un certain délai qui, pour le Rouget, peut être fixé à huit jours et pour le Charbon à six jours. Ces résultats sont d'ailleurs en accord avec la règle appliquée dans la pratique.

SUR UNE MÉTHODE DE MISE EN CULTURE DE LEUCOCYTES HUMAINS A PARTIR DU SANG CIRCULANT

par R. NETTER et G. BARSKI.

(Institut Pasteur, Service des Virus [Dr P. LÉPINE]
et Institut d'Hygiène.)

La culture prolongée des éléments figurés du sang, *in vitro*, bien que pratiquée depuis très longtemps, présente toujours des difficultés techniques considérables.

Comme on le sait, les hématies ainsi que la grande majorité des leucocytes (lymphocytes et polynucléaires bien différenciés) subissent *in vitro* une dégénérescence très rapide et ne sont pratiquement pas cultivables.

Le problème des cultures consiste donc essentiellement à éliminer de l'ensemble des éléments figurés du sang la masse de cellules non viables qui constitue dans le sang circulant humain normal 99,99 p. 100 du nombre total des cellules.

On sait depuis longtemps que les cellules proliférantes dans les conditions habituelles de culture, doivent constituer une population suffisamment dense ; si cette condition n'est pas réalisée, la culture dégénère rapidement.

Cette concentration des leucocytes viables destinés à la culture s'obtient dans la méthode classique par centrifugation du sang total hépariné, qui aboutit à la formation d'une couche leucocytaire à la surface du culot ; cette couche coagulée par adjonction de 1 goutte d'extrait tissulaire constitue le matériel de culture après élimination du plasma surnageant.

Malgré les progrès considérables dans les techniques de cultures tissulaires en général, la préparation du matériel cellulaire à partir du sang, n'a point évolué depuis les premiers travaux de Carrel ou Lewis.

Pourtant, les inconvénients de cette méthode ne sont pas négligeables. Evoquons en particulier :

a) les différences importantes de récoltes leucocytaires suivant la vitesse de sédimentation du sang ;

b) les difficultés à former un caillot uniforme, englobant les leucocytes de la surface du culot de centrifugation ;

c) l'utilisation d'un extrait tissulaire.

De toute manière, par cette méthode, une grosse partie des leucocytes est entraînée avec les hématies et perdue pour la culture ; d'un autre côté, le gâteau leucocytaire contient dans ces conditions beaucoup d'hématies.

On tente de tourner ces difficultés en cultivant, au lieu des leucocytes sanguins, de la moelle osseuse beaucoup plus riche en cellules jeunes et proliférant bien *in vitro*. On aperçoit cependant facilement tous les inconvénients pratiques et théoriques de cette solution.

Nous avons cherché à améliorer la mise en culture des leucocytes du sang circulant pour éviter certains inconvénients de la méthode classique.

Le procédé que nous décrivons est réalisable avec un matériel facilement accessible. Nous l'avons pratiqué en partant de sang d'adultes de 20 à 35 ans dont la leucocytose s'échelonnait entre 6 000 et 12 000 par millimètre cube.

10 cm³ de sang sont prélevés avec les mêmes précautions que pour une hémoculture. Ce sang est immédiatement additionné d'héparine (1 à concentration limite.

Trop forte, en effet, la coagulation ultérieure ne se produit pas, alors que trop faible, elle se fait avant même la séparation des globules blancs ; VI à VIII gouttes d'héparine ramenée à la concentration de 0,25 p. 100 par du liquide de Tyrode suffisent pour 8 à 10 cm³ de sang.

La sédimentation et la séparation des leucocytes sont basées sur la méthode décrite par Robineaux, J. Lebrun, Kourilsky et Delaunay [4].

Les 10 cm³ de sang hépariné sont additionnés de 2,5 cm³ environ de

polyvinyl-pyrrolidone à 3 p. 100 (2) ; le tube est ensuite mis en position inclinée à 45°, dans l'étuve à 37°, pendant trente minutes. A ce moment, les globules rouges sont sédimentés et on recueille à la pipette Pasteur le plasma surnageant qui contient les globules blancs et encore quelques hématies.

On procède alors à une centrifugation modérée de 1 500 tours pendant trois à cinq minutes.

Le plasma est mis de côté pour servir de support aux cultures. Après de multiples essais avec différents extraits tissulaires et plasmas (homologues et hétérologues), nous avons préféré la technique suivante :

Une préparation de thromboplastine [2, 3] est faite en Tyrode.

Dans un essai préliminaire nous déterminons la concentration minima par addition de I goutte du plasma hépariné à I goutte de la solution de thromboplastine.

Le culot de centrifugation est coagulé par I goutte de cette solution ; le caillot contenant les leucocytes englobés et un minimum d'érythrocytes est ensuite découpé en fragments de 1 mm² environ.

La méthode de mise en culture a été décrite en détail par l'un de nous [4].

Elle consiste à réaliser les cultures sur des lames de verre de 20 × 25 mm sur lesquelles on dépose des anneaux de verre. Les anneaux sont fixés sur la lame avec I goutte de plasma coagulé, formant ainsi des alvéoles à l'intérieur desquelles se fait la culture. Le support des cellules est constitué par un mélange en quantité équivalente de plasma humain hépariné, additionné éventuellement d'antibiotiques et de solution de thromboplastine en Tyrode.

Nous pratiquons le renouvellement du milieu tous les trois jours à l'aide d'un mélange à parties égales de sérum et de Tyrode, ce qui forme ainsi à l'intérieur des alvéoles une phase liquide au-dessus de la phase solide.

Les cultures observées au bout de deux, quatre et six jours montrent une migration considérable.

La physionomie de la population cellulaire est bien caractéristique des cultures de leucocytes du sang normal.

On observe, en particulier, de nombreux macrophages et cellules histiocytaires. L'aspect du noyau et les prolongements protoplasmiques témoignent de la vitalité et de l'activité de ces cellules au bout de six jours de culture ; il en est de même des cellules en division.

A noter qu'un résultat semblable est obtenu lorsque le plasma servant à la culture est subtosané.

Le traitement des leucocytes avec cette substance pour en faciliter l'isolement n'entrave donc pas leur croissance, même quand l'action du subtosan se prolonge pendant plusieurs jours.

Résumé. — Il est possible d'obtenir des cultures de leucocytes humains dont la séparation préalable a été obtenue à l'aide de polyvinyl-pyrrolidone à 3 p. 100. Le milieu de culture est constitué de plasma humain hépariné coagulé par une solution de thromboplastine, et d'une phase liquide composée de sérum dilué.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] G. BARSKI. *Ces Annales*, 1948, **74**, 1.
- [2] B. V. FAVATA. *Arch. Path.*, 1947, **44**, 321.
- [3] K. R. PORTER et C. V. Z. HAWN, *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1947, **65**, 309.
- [4] R. ROBINEAUX, J. LEBRUN, R. KOURILSKY et A. DELAUNAY. *Ces Annales*, 1949, **77**, 710.

TECHNIQUE D'ÉTUDE *IN VITRO* DU CONTACT DISCONTINU DES GERMES ET DES SUBSTANCES ANTIMICROBIENNES

par B. KREIS.

L'essai *in vitro* des substances antimicrobiennes à usage thérapeutique se fait en recherchant la concentration minimum susceptible d'inhiber la culture dans un milieu où le produit est en contact avec les germes de façon permanente et à un taux stable.

Mais ces conditions ne se retrouvent pas lors de l'administration *in vivo*. Celle-ci étant toujours discontinue, les éléments microbiens se trouvent soumis à des concentrations oscillantes. L'expérience clinique a montré que dans beaucoup de cas ces concentrations pouvaient même s'annuler pendant un temps plus ou moins long sans nuire à l'effet thérapeutique.

Il nous paraît possible de préciser expérimentalement, pour la plupart des germes, l'action bactériostatique des divers antimicrobiens en fonction des durées de contact et des doses utilisées. Il suffit pour cela d'utiliser l'artifice technique de la culture sur lames :

On coupe en deux, dans le sens de la longueur, des lames porte-objets ordinaires, de façon à obtenir des lames étroites faciles à introduire dans un tube à essai de 16 mm. A l'extrémité d'une lame stérilisée on étale, sur 2 à 3 cm, une couche mince d'un substrat convenable préalablement ensemencé d'une culture jeune du microbe à étudier. Le substrat doit permettre le développement du germe en cause, être perméable à l'antimicrobien, adhérent au verre, transparent ; il doit pouvoir sécher rapidement (albumine d'œuf, gélose-gélatine, sérum peuvent convenir). La richesse de l'ensemencement doit être suffisante pour qu'on puisse trouver au microscope des éléments dans tous les champs ; ces éléments doivent être isolés ou en très petits amas. Pour certaines recherches on pourra, au lieu d'un substrat artificiel, utiliser un pus, un exsudat pathologique contenant le germe en cause.

Après dessiccation complète en boîte de Petri, on plonge la lame dans un tube à essai, contenant un milieu nutritif approprié sur une hauteur telle que la lame déborde d'au moins un tiers de sa longueur le niveau du liquide. On porte quelques heures à l'étuve de façon à assurer un très léger début de prolifération microbienne. On

retire alors la lame du tube au moyen d'une pince longuette flambée et on la transfère rapidement dans un autre tube de milieu nutritif additionné cette fois d'antimicrobien et préalablement porté à 37°. On laisse à l'étuve pour la durée du contact qu'on désire étudier. On retire alors de nouveau la lame de son tube en l'égouttant soigneusement à l'intérieur du tube ; on la porte, pour lavage, dans un tube d'eau distillée à 37° où elle reste dix à quinze minutes, puis dans un autre ; on la transfère ensuite (si besoin après plusieurs de ces lavages) dans un nouveau tube de milieu de culture à 37° sans antimicrobien et on remet à l'étuve. Les divers passages peuvent être répétés aussi souvent qu'on le désire.

Pour chaque expérience on utilisera 3 lames identiques en raison des possibilités de contamination. Au moins 8 lames témoins sont nécessaires. Trois seront en contact permanent avec l'antimicrobien : l'une reste de bout en bout dans un même tube ; les deux autres subissent le même nombre de transferts et de lavages que les lames en expérience, mais passent d'un tube additionné d'antimicrobien à un autre également additionné d'antimicrobien. Trois autres lames n'auront aucun contact avec l'antimicrobien : l'une reste de bout en bout dans un même tube de milieu pur ; les deux autres subissent le même nombre de transferts et de lavages que les lames en expérience, mais passent du milieu de culture pur à un autre tube de milieu de culture pur. Enfin les deux dernières subissent les mêmes transferts, mais restent en contact avec un milieu non nutritif et non inhibant (en principe de l'eau distillée) pendant que les lames en expérience sont en contact avec l'antimicrobien.

La lecture se fera dès que les témoins sans antimicrobien auront nettement poussé. Elle peut porter soit sur les lames, soit sur le dernier milieu où les lames auront été plongées : dans ce cas on peut étudier opacimétriquement le retard d'apparition du trouble par rapport aux témoins.

Il est, bien entendu, possible de réaliser un appareil à circulation continue, permettant de renouveler le milieu de culture sans qu'on ait à sortir la lame et de faire varier les concentrations en antimicrobien de façon progressive, mais on pourra le plus souvent se contenter de la technique ci-dessus qui a l'avantage d'être extrêmement simple.

ACTION SUR LE BACILLE DE KOCH D'UN CONTACT INTERMITTENT *IN VITRO* AVEC LA DIHYDROSTREPTOMYCINE

par ÉTIENNE BERNARD et B. KREIS.

(Clinique de la Tuberculose. Faculté de Médecine.)

Dans le traitement de la tuberculose, on pratique actuellement de façon habituelle une seule injection intramusculaire quotidienne de 1 g de dihydrostreptomycine. Cette dose entraîne des concentrations san-

guines qui varient dans les huit premières heures entre 50 et 5 unités puis s'annulent en vingt-quatre heures. Certains auteurs tendent même à réduire le nombre des injections à une tous les deux ou trois jours.

Nous avons utilisé la technique sur lames précédemment exposée pour étudier *in vitro* l'action sur le bacille de Koch de ces contacts intermittents avec la dihydrostreptomycine.

L'expérience a porté sur une souche de collection (souche Brévannes de l'Institut Pasteur). 1 cm³ de culture en milieu de Dubos de quatre à cinq jours est ajouté à 1 cm³ de blanc d'œuf frais et stérile, dont une mince couche est ensuite séchée sur les lames. Les milieux de culture ont été le milieu de Youmans (à 5 p. 100 seulement de sérum humain citraté) et le sang conservé (dilué à parties égales d'eau distillée) : le milieu de Dubos n'a été employé que dans quelques essais. Une deuxième série d'expériences a utilisé, au lieu d'une souche de collection en blanc d'œuf, des frottis de crachats tuberculeux (dont il faut alors détruire la flore d'infection secondaire par un passage de six minutes dans l'acide sulfurique à 6 p. 100 ; on lave à l'eau distillée dans un verre stérile avant de plonger la lame dans le milieu de culture).

Nous avons constaté que le contact des bacilles avec la dihydrostreptomycine inhibe leur reproduction pour un temps qui dépasse celui du contact, et qui augmente avec la concentration de dihydrostreptomycine.

Pour la souche Brévannes dont la sensibilité est de l'ordre de 0.4 unité par centimètre cube en milieu de Youmans, des contacts répétés huit heures sur vingt-quatre heures dans ce milieu avec une concentration de 1 unité par centimètre cube n'empêchent pas le bacille de se développer, et la culture examinée au dixième jour est à peine moins abondante que pour les témoins sans streptomycine ; si l'exposition n'est que de huit heures sur quarante-huit heures on ne constate même plus aucun retard de développement. Avec une concentration de 2 à 6 unités par centimètre cube, au contraire, les contacts de huit heures sur vingt-quatre entravent presque totalement la culture mais les contacts de huit heures sur quarante-huit laissent se développer de gros amas microscopiques. Avec 10 unités par centimètre cube on peut constater facilement l'augmentation progressive de la culture, selon que la durée de contact a été huit heures sur vingt-quatre heures (culture nulle), huit heures sur quarante-huit heures (début microscopique de culture), huit heures sur soixante-douze heures (gros amas microscopiques), etc. Mais même un seul contact de huit heures tous les huit jours peut suffire à diminuer l'importance des colonies. Avec 15 unités par centimètre cube l'inhibition est presque totale pour les durées de contact de huit heures sur quarante-huit heures et huit heures sur soixante-douze heures. Il en est de même des taux de 20 unités par centimètre cube dont l'action est encore très manifeste avec des contacts de huit heures sur quatre-vingt-seize heures. Les résultats sont semblables avec 50 unités par centimètre cube.

Ainsi, des concentrations de l'ordre de celles qu'on réalise chez l'homme avec une seule injection de 1 g de dihydrostreptomycine suffisent en milieu de Youmans au sérum humain à inhiber totalement ou à ralentir considérablement la culture du bacille tuberculeux, même si le bacille n'y est soumis que tous les deux ou trois jours.

Mais ces résultats ne sont pas retrouvés lorsqu'on utilise des souches

partiellement résistantes. C'est ainsi que pour deux souches dont la sensibilité, titrée en milieu de Dubos avec la technique habituelle, est comprise entre 2 et 5 unités pour l'une, entre 5 et 10 unités pour l'autre, l'exposition à 15 unités par centimètre cube de streptomycine pendant huit heures par jour en milieu de Dubos et de Youmans n'a pas empêché le développement de petites colonies microscopiques ; avec huit heures sur soixante-douze les cultures ne se distinguent pas des témoins. Une telle constatation ne nous paraît pas sans intérêt, et montre combien on risque d'être induit en erreur, dans l'évaluation de la résistance des germes, en s'en tenant à nos techniques actuelles de mesure de la résistance ; celles-ci jugent d'après un contact continu avec une quantité fixe d'antibiotique, alors que les concentrations cliniques sont variables et intermittentes.

Les résultats obtenus diffèrent aussi sensiblement lorsqu'on utilise des frottis de crachats tuberculeux avec comme milieu de culture du sang humain conservé, dilué à parties égales d'eau distillée. Les taux nécessaires à la bactériostase s'élèvent nettement. Même avec 20 unités par centimètre cube, un contact de huit heures par jour n'empêche pas un début de culture de se manifester avec une souche inhibée en milieu de Youmans par un contact de huit heures sur soixante-douze heures. A la concentration de 10 unités par centimètre cube que nous avons étudiée sur 17 souches différentes prises au hasard de la clinique, deux fois seulement l'inhibition s'est manifestée pour un contact de huit heures sur soixante-douze. Dans la plupart des cas, la culture a été relativement peu gênée même par un contact de huit heures sur vingt-quatre heures et la durée de huit heures sur quarante-huit heures s'est révélée inefficace. Ces résultats s'interprètent par les différences de sensibilité en sang conservé et en milieux artificiels (la souche Brévannes a une résistance inférieure à 0,4 en Youmans et en Dubos et comprise entre 1 et 2 en sang conservé) et la fréquence des souches partiellement résistantes dans nos essais.

On voit comme ces tests *in vitro* doivent être transposés avec prudence en clinique. Nous croyons cependant qu'ils peuvent faciliter une étude plus précise des conditions d'activité thérapeutique de la streptomycine.

ACTION SUR LE BACILLE DE KOCH D'UN CONTACT INTERMITTENT *IN VITRO* AVEC LA NÉOMYCINE

par ÉTIENNE BERNARD et B. KREIS.

(Clinique de la Tuberculose. Faculté de Médecine.)

Nous avons pu appliquer la méthode de transferts successifs de cultures sur lame à un échantillon de néomycine titrant 200 000 unités au gramme.

La souche utilisée a été la souche Brévannes qui s'est montrée sensible à 0,8 unité par centimètre cube en milieu de Youmans et en sang

conservé et à 1 unité par centimètre cube en milieu de Dubos. Nous avons étudié les concentrations de 5, 10, 15 et 20 unités par centimètre cube sur les milieux de Dubos, de Youmans (à 5 p. 100 de sérum humain citraté), et le sang conservé dilué à parties égales d'eau distillée.

Les résultats résumés par les tableaux ci-après montrent qu'à toutes ces concentrations l'inhibition de la culture a été obtenue avec un contact de huit heures sur vingt-quatre heures, huit heures sur quarante-huit heures et huit heures sur soixante-douze heures (dans ce dernier cas, début de culture à 5 et 10 unités). Le contact de huit heures sur quatre-vingt-seize heures a été suffisant aux taux de 15 et 20 unités par centimètre cube en milieu de Youmans.

**Activité tuberculostatique de la néomycine
en contact discontinu avec le bacille de Koch.**

MILIEU UTILISÉ	TÉMOIN 0	TÉMOIN néomycine	8 HEURES chaque jour	8 HEURES 1 jour sur 2	8 HEURES 1 jour sur 3	8 HEURES 1 jour sur 4
<i>Néomycine 5 u/cm³ :</i>						
Dubos	++++	0	0	0	±	+
Youmans	+++++	0	0	0	±	+
Sang conservé dilué .	+++++	0	0	+	++	+++
<i>Néomycine 10 u/cm³ :</i>						
Dubos		0	0	0	±	0
Youmans	+++	0	0	0	Cont.	±
Sang conservé dilué .		0	0	0	±	++
<i>Néomycine 15 u/cm³ :</i>						
Dubos	+++	0	0	0	0	±
Youmans	+++++	0	0	0	Cont.	0
Sang conservé dilué .	+++++	0	0	0	0	+++
<i>Néomycine 20 u/cm³ :</i>						
Dubos	+++	0	0	0	0	0
Youmans	+++++	0	0	0	0	0
Sang conservé dilué .	+++++	0	0	0	+	++

Seabury (1) a montré qu'une injection de 0,50 g d'une néomycine, titrant également 200 000 unités au gramme, entraînait chez l'homme une concentration sanguine de 10 unités par centimètre cube pendant huit heures au moins.

Si nos constatations pouvaient être transposées en clinique, elles permettraient ainsi d'atténuer considérablement le risque d'accidents toxiques par la néomycine en incitant à diminuer les doses et à raréfier les injections.

(1) Trans. ninth. Strept. conf., 1950, 176.

Nous espérons que la notion d'une action prolongée des antibiotiques sur le bacille de Koch, même après disparition du produit dans le milieu ambiant, permettra l'utilisation thérapeutique, non seulement de la néomycine, mais aussi d'autres substances actuellement délaissées en raison d'une toxicité relative.

LES TAUX EXTRÊMES DE LA STREPTOMYCINO-RÉSISTANCE DU BACILLE DE KOCH

par A. SAENZ et G. CANETTI.

(Institut Pasteur. Laboratoires de Recherches sur la Tuberculose.)

Les titrages habituels de la streptomycino-résistance du bacille de Koch ne vont pas au delà de concentrations de 50, 100, au meilleur cas 1 000 μ g de streptomycine par centimètre cube de milieu. Ces concentrations sont suffisantes pour établir qu'une souche est résistante, puisqu'elles dépassent celles que les doses de streptomycine habituellement employées permettent de réaliser dans l'organisme ; mais dans bien des cas, elles ne renseignent pas sur le taux extrême de la concentration dans laquelle la souche peut encore pousser.

Pour élucider ce point, nous avons poursuivi jusqu'à la concentration de 50 000 μ g par centimètre cube le titrage de 50 souches, pour lesquelles un premier titrage nous avait montré qu'elles poussaient toutes à la concentration de 1 000 μ g. Ces souches provenaient de phthisiques ayant été soumis à la streptomycinothérapie pendant dix-huit à deux cent vingt jours. La méthode employée fut celle décrite précédemment (1) ; le titrage était fait dans 7 tubes de milieu de Youmans, auxquels des doses de 0, 1 000, 2 000, 5 000, 10 000, 20 000 et 50 000 μ g de streptomycine par centimètre cube avaient été ajoutées. La semence était de 0,2 mg de bacilles par tube ; la lecture était faite au quinzième jour. La sensibilité de la souche, ou *titre*, est représentée par la concentration en streptomycine du premier tube de milieu de Youmans dans lequel il n'y a plus culture. Les résultats ont été les suivants :

	TITRE					
	2 000	5 000	10 000	20 000	50 000	> 50 000
Nombre de cas . .	6	13	11	1	1	18
Pourcentage. . . .	12	26	22	2	2	36

(1) *Rev. tub.*, 1949, **13**, 746.

On voit que le nombre de souches dont le titre est de beaucoup supérieur à 1 000 μg est fort élevé ; dans 40 p. 100 des cas, il dépasse 10 000 μg et, dans 36 p. 100, 50 000 μg . La difficulté de dissoudre la streptomycine dans le milieu de Youmans à de plus fortes concentrations ne permet guère de pousser le titrage au delà.

Il était intéressant de se demander si le rapport étroit qui existe entre la durée du traitement et le degré de la résistance se vérifie pour ces résistances extrêmes. Pour préciser cela, nous avons divisé nos cas en deux groupes, dont l'un comprend les malades ayant été traités pendant moins de cent jours (de dix-huit à quatre-vingt-dix-neuf ; en moyenne soixante-seize) ; et l'autre, les malades traités pendant plus de cent jours (de cent à deux cent vingt ; en moyenne cent quarante-huit). 91 p. 100 des malades avaient reçu 1 g par jour. Les résultats ont été les suivants :

DURÉE du traitement	TOTAL des cas	TITRE					
		2 000	5 000	10 000	20 000	50 000	> 50 000
< 100 jours. . .	30	5	11	8	0	1	5
		24 = 80 p. 100.			6 = 20 p. 100.		
> 100 jours. . .	20	4	2	3	4	0	13
		6 = 30 p. 100.			14 = 70 p. 100.		

On voit que parmi les sujets ayant été traités moins de cent jours, la fréquence des résistances les plus élevées est bien moindre que parmi ceux traités plus de cent jours. En groupant ensemble les résistances égales ou inférieures à 10 000 μg d'une part, égales ou supérieures à 20 000 μg d'autre part, on a chez les sujets les moins traités 80 p. 100 de résistance du premier type et 20 p. 100 du second, alors qu'on en a respectivement 30 p. 100 et 70 p. 100 chez les sujets les plus traités.

Ainsi, l'apparition de variantes de plus en plus résistantes se poursuit bien tout au long de la streptomycinothérapie.

A PROPOS DE L'ACTION DE CERTAINES PEPTONES (TRYPTOSE) SUR LES *BRUCELLA*

par L. CARRÈRE, G. RENOUX et H. QUATREFAGES.

(Centre OMS/OAA de Recherches sur la Fièvre ondulante. Montpellier.)
[Directeur : Professeur L. CARRÈRE.]

Nous avons constaté, comme Schuhardt et ses collaborateurs [1], que certains lots de « tryptose Difco » possédaient une action inhibitrice marquée sur le développement des *Brucella*, action qui, avec un lot de cette peptone, allait jusqu'à l'empêchement total de la croissance bactérienne.

L'alarme étant donnée, nous n'avions pas jugé utile de rapporter ce fait à notre tour.

Dans de nouvelles publications, les auteurs susnommés concluent que la toxicité de la tryptose pour les *Brucella* serait due à la présence dans le milieu d'un dérivé oxydé de la cystine qui apparaîtrait sous l'influence de l'âge du lot envisagé et serait augmenté par l'autoclavage [2, 3].

Cette question semblait donc réglée : grâce aux soins pris par le fabricant et aux précautions du laboratoire qui, avant l'emploi en série, vérifiait chaque lot de milieu, la « tryptose Difco », sous forme de bouillon tryptose ou de bouillon tryptose gélosé, continuait à être un milieu de culture couramment utilisé, pratique et donnant de bons rendements.

Deux incidents récents, que nous tenons à rapporter avant même d'en avoir recherché l'explication, obligent à réviser cette attitude :

Premier fait : Nous repiquons sur bouillon gélosé tryptosé (tryptose agar) 25 souches de *Brucella* (18 *Br. melitensis*, 5 *Br. abortus* et 2 *Br. suis*) conservées depuis trois à cinq ans en liquide de Legroux [sérum de cheval dilué et formolé sous huile de vaseline] (1) ; leur développement est correct, mais aucune des souches ainsi cultivées n'est agglutinée par les sérums anti-*Brucella* que possède le laboratoire. Cette inhibition de l'agglutinabilité par culture sur tryptose agar ne s'étendait pas aux *Salmonella* : une dizaine de souches ensemencées sur ce milieu conservent toutes leurs caractéristiques.

Cette inhibition de l'agglutinabilité spécifique des *Brucella* était transitoire puisqu'un ou deux repiquages sur bouillon gélosé de Stafseth rendait à ces bactéries leur aptitude antigénique.

Second fait : Nous préparons, selon la technique simple utilisée depuis

(1) Ce liquide, car ce n'est pas un milieu de culture, permet aisément une excellente conservation pendant des années (trois à cinq ans en moyenne) des souches de *Brucella* sous la forme exacte qu'elles avaient au moment de leur « embaumement » : bactériostase, phase coloniale (S. R, etc.), virulence, pouvoir antigène.

douze ans, du bouillon gélosé par adjonction d'agar « Difco » à du bouillon tryptose ; il s'agissait d'un flacon neuf de « tryptose broth » de fabrication récente reçu deux mois auparavant. Ce milieu, réparti en boîtes de Jouan, est ensemencé avec la souche de *Br. suis* P 900 (cf. Carrère et Quatrefages [4]) soigneusement conservée et vérifiée « smooth » en vue de la préparation d'antigène pour la réaction d'agglutination.

Ce lot d'antigène agglutine spontanément et rapidement abandonné à lui-même à la température du laboratoire.

Nous avons immédiatement entrepris les vérifications nécessaires de l'eau distillée, de la solution saline, de la verrerie utilisées : toutes étaient correctes.

Douze autres souches de *Brucella* de notre collection ont été alors ensemencées, et à neuf la souche P 900, sur ce lot de tryptose agar : la culture des *Brucella* sur ce milieu aboutit à une transformation totale, seules les variétés « R » s'y développent sous leur forme rapidement auto-agglutinable.

C'est le seul milieu de culture solide qui nous ait montré pareille « activité ». Jamais, depuis la fondation du C. R. F. O., aucun milieu, et en particulier la gélose au foie, n'avait amené de tel et si fâcheux incident.

Ces deux incidents, dont la rareté ne diminue pas la gravité — nous songeons, par exemple, aux laboratoires qui ne manipulent pas les *Brucella* habituellement et sur une grande échelle et qui ont pu ou peuvent croire à la négativité d'une hémoculture développée sur milieu à la tryptose puisque l'agglutination de cette souche par un sérum spécifique est négative — nous font conclure qu'il faut abandonner ce milieu pour la culture des *Brucella*.

Résumé. Outre leur pouvoir inhibiteur vis-à-vis des *Brucella* — pouvoir dont il est facile de se rendre compte en vérifiant chaque lot — les milieux à base de « tryptose » peuvent parfois présenter d'autres inconvénients qui nous semblent plus graves, car plus insidieux : inhibition de l'agglutinabilité des *Brucella* ou transformation rapide et totale en souches « R » spontanément agglutinables.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] V. T. SCHUHARDT, L. J. RODE, J. W. FOSTER et G. OGLESBY. *J. Bact.*, 1949, **57**, 1-8.
- [2] V. T. SCHUHARDT, L. J. RODE et G. OGLESBY. *J. Bact.*, 1949, **58**, 665-674.
- [3] V. T. SCHUHARDT, L. J. RODE, G. OGLESBY et C. E. LANKFORD. *J. Bact.*, 1950, **60**, 655-660.
- [4] L. CARRÈRE et H. QUATREFAGES. *Presse Méd.*, 1950, **58**, n° 29, 518-519.

Les communications suivantes paraissent ou paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

La streptomycino-résistance de souches de bacilles de Koch provenant de lésions pulmonaires différentes d'un même malade, par G. CANETTI et A. SAENZ.

Antibiotiques et lyse bactériophagique. VIII. L'action de l'auréomycine sur la lyse bactériophagique étudiée au microbiophotomètre, par Michel FAGUET et Ewald EDLINGER.

Etude des séro-agglutinations de Courmont et de Hollande chez la femme enceinte, par R. OULES et MALBOS (de Montpellier).

LIVRES REÇUS

S.A. Waksman. — *The Actinomycetes. Their nature, occurrence, activities and importance.* (Annales Cryptogamici et Phytopathologici, vol. 9). Waltham, Mass., U.S.A. : The Chronica Botanica Co. Librairie P. Raymann, 17, rue de Tournon, Paris-6^e. 1 vol., 230 p., 38 fig. Prix : 5 dollars.

Waksman, dont chacun reconnaît la compétence dans le domaine des Actinomycètes auquel, comme il le rappelle dans la préface, il a consacré sa vie, fait le point de nos connaissances sur la question. Les Actinomycètes sont extrêmement répandus dans la nature : sol, fumier, eau, poussières, etc., mais leur position systématique a été assez difficile à préciser, du fait de leurs rapports avec les Champignons d'une part, avec les Bactéries d'autre part. On les considère maintenant comme des Bactéries, mais on a dû créer pour eux un ordre spécial, les Actinomycétales, qui se distinguent des véritables Bactéries, les Eubactériales. Waksman étudie d'abord la morphologie des Actinomycètes et de leurs bactériophages, et donne des uns et des autres des photographies au microscope électronique, puis leur physiologie, leurs mutations, leur métabolisme, et en particulier les enzymes et les vitamines (facteurs de croissance) qu'ils produisent. Le rôle des Actinomycètes dans les processus naturels est considérable : le grand nombre de leurs colonies dans le sol, le fait qu'ils se développent à de grandes profondeurs, que l'aridité du sol favorise leur pullulation, montre leur importance dans la décomposition des résidus végétaux et animaux et les processus d'humification. Ils semblent également être des agents géologiques importants (transformation des boues des lacs, etc.). S'ils ne sont pas, comme les bactéries et les virus, responsables des grandes épidémies qui affectent le monde animal ou végétal, ils sont pourtant des agents pathogènes non négligeables. Mais la propriété des Actinomycètes qui a, depuis quelques années, retenu surtout l'attention tant du monde savant que du profane, c'est celle de produire des antibiotiques. Depuis sept ou huit ans, on en a isolé près de 30 et personne n'ignore plus la place capitale qu'ils occupent dans la thérapeutique des maladies infectieuses. Dans ce domaine, la contribution de Waksman a été particulièrement précieuse puisqu'elle a découvert la streptomycine et été à l'origine de son rôle important dans la lutte contre la tuberculose. Ainsi les Actinomycètes se sont révélés une arme de valeur pour combattre les infections humaines et animales et, malgré les succès déjà obtenus, leurs possibilités ne sont pas encore épuisées. De quelle importance sont leurs propriétés antagonistes dans les processus qui se déroulent dans le sol ? On ne

le sait pas encore exactement, mais on peut d'ores et déjà conclure avec l'auteur que les Actinomycètes prennent place parmi les grands groupes de micro-organismes qui affectent l'économie humaine et que leur importance ne peut plus être méconnue. Une bibliographie de 23 pages complète l'ouvrage.

P. LÉPINE.

J.B. McDougall. — *Tuberculosis. A global study in social pathology.* E.S. Livingstone Ltd, 16-17, Teviot Place, Edinbourg, édit. 1 vol., 455 p., 29 fig. Prix : 32 Sh. 6 d.

Revue générale des problèmes, nombreux et complexes, que posent la morbidité et la mortalité par tuberculose dans les différents pays du monde, ainsi que les facteurs (âge, hérédité, dose infectante, résistance naturelle, raciale, etc.) qui influencent cette morbidité. Un plan général est proposé pour l'étude de la maladie dans une communauté, qui envisage les divers éléments qui peuvent intervenir et, d'autre part, l'organisation des services antituberculeux (assurances, vaccinations par le BCG, etc.).

P. L.

F.M. Burnet et F. Fenner. — *The production of antibodies.* Monographie du Walter and Eliza Hall Institute, Melbourne. Macmillan et Co. Ltd, St. Martin's street, London, W.C.2, édit. 1 vol., 142 p., 10 fig. Prix : 12 Sh. 6.

Les auteurs s'attachent surtout à l'aspect biologique du problème, négligeant volontairement la partie physique et physico-chimique, qui a été traitée par d'autres chercheurs : Landsteiner, Marrack, etc. Après une étude des variations du titre des anticorps chez les animaux activement et passivement immunisés — en particulier de la différence entre la réaction à une première et à une seconde injection d'antigène — ils recherchent le lieu de formation des anticorps. Les cellules du système réticulo-endothélial, auxquelles on avait d'abord attribué un rôle primordial, ne semblent plus, actuellement, avoir l'importance qu'on leur croyait, et ce sont maintenant les lymphocytes et plus encore les plasmocytes qui paraissent être le siège de la formation des anticorps, ou plutôt cette formation doit se faire dans les ganglions lymphatiques régionaux, avec la participation plus ou moins grande des différentes cellules du ganglion. Les anticorps continuent-ils à se former après la disparition de l'antigène ? Il semble bien qu'on doive l'admettre, puisque certaines immunités, en particulier celles consécutives aux maladies à virus, persistent toute la vie et que l'existence individuelle des cellules productrices d'anticorps ne peut être aussi longue. Les auteurs critiquent la théorie de Pauling et coll., qui essaie de rendre compte de la formation des anticorps par un mécanisme qui conférerait à la molécule de globuline une configuration complémentaire de celle de la molécule d'antigène. Ils exposent une nouvelle façon de voir, qui rapproche la formation des anticorps de celle des enzymes adaptatifs. Enfin, les derniers chapitres sont consacrés aux anticorps impliqués dans les phénomènes de sensibilisation et à l'immunologie des transfusions sanguines, des greffes cutanées et des tumeurs.

P. L.

Mark F. Boyd. — *Malariology*. W.B. Saunders Cy. Philadelphia and London, 1949. Vol. I et II, 787 pages et 1.643 pages, 26 x 18 cm.

Les deux volumes de l'auteur ont pour objet de réaliser un manuel qui embrasse toutes nos connaissances actuelles sur le paludisme envisagé sous tous ses aspects. On peut dire que dans l'ensemble ce but est pleinement atteint. Il est bien évident qu'une œuvre d'une pareille envergure ne pouvait être menée à bien par un seul auteur et, effectivement, il n'a pas fallu faire appel à moins de 65 auteurs pour accomplir cette tâche. Après une introduction historique et un chapitre qui offre une étude détaillée de tous les parasites connus du paludisme (cycle vital, culture), avec de nombreuses illustrations, l'ouvrage étudie successivement les différents hôtes des *Plasmodium* : le moustique, chez qui se fait le cycle sexuel (definitive host) et l'homme ou les autres espèces animales qui hébergent le stade larvaire (intermediate host). Dans la première partie, toutes les questions concernant la morphologie, la physiologie, l'écologie des différentes espèces d'Anophèles et des *Culex* des divers pays sont étudiées, ainsi que l'infection expérimentale du singe et des oiseaux. Dans la seconde partie, tout ce qui concerne le paludisme de l'homme est passé en revue : la clinique, l'aspect et la répartition dans les différents pays, l'épidémiologie, l'anatomie pathologique et l'immunité du paludisme, ses rapports avec la fièvre bilieuse hémoglobininurique, sa prophylaxie, la lutte contre les moustiques, etc. Une bibliographie souvent très importante suit chacun des articles. Enfin, un index alphabétique très détaillé, qui ne comprend pas moins de 148 pages, permettra au lecteur de retrouver facilement et rapidement dans les deux volumes tous les points qui l'intéressent.

On peut, cependant, regretter que les bandeaux en haut des pages ne donnent pas le nom des chapitres et que, par exemple, la clinique et le traitement du paludisme de l'homme soient rangés sous le terme générique de « intermediate host ». Des subdivisions plus clairement présentées auraient mieux guidé le lecteur et facilité les recherches. Malgré ces critiques, cet ouvrage reste un document unique sur l'ensemble de nos connaissances en matière de paludisme.

P. L.

S. Hirzel. — *Experimentelle veterinärmedizin*, t. I, édit., Leipzig, 1950.

Les Editions Hirzel, de Leipzig, publient le premier numéro d'une revue ayant pour objet de diffuser les résultats des recherches expérimentales et cliniques effectuées dans le domaine de la médecine des animaux par les travailleurs allemands.

Le champ d'études est vaste et loin d'être épuisée la matière ; on peut être assuré que nos collègues d'outre-Rhin mettront à profit leur science de l'expérimentation et leur souci du travail méthodique pour enrichir le patrimoine commun d'acquisitions originales solidement établies.

Placée sous le patronage des professeurs Leriche, de l'Institut d'Hygiène alimentaire de l'Université Humboldt, et Cohrs, de l'Ecole vétérinaire de Hanovre, la nouvelle revue a pour rédacteur en chef le professeur Rohrer de l'Institut de Riems.

C'est sous la signature de celui-ci que paraît le premier mémoire,

consacré à la préparation et à l'emploi du vaccin anti-aphteux ; il est suivi de travaux concernant notamment la culture du virus aphteux, l'histopathologie de la maladie de Newcastle, le diagnostic différentiel et la thérapeutique de la maladie de Carré, l'épreuve des sérums anti-rouget par l'inhibition de l'hémagglutination.

Une telle entreprise porte en soi les meilleures chances de durer et de se développer ; il faut souhaiter, pour elle, que ne se renouvellent jamais les événements tragiques qui mirent fin, naguère, à la parution des périodiques vétérinaires allemands.

H. JACOTOT.

J.N. Davidson. — *The Biochemistry of the Nucleic Acids*. Methuen and Co. Ltd, London, 1950, 163 pages, 17×11 cm. Prix : 7 Sh. 6 d.

L'excellente collection Methuen des monographies de chimie biologique nous offre, aujourd'hui, ce remarquable précis sur la chimie biologique des acides nucléiques, sans aucun doute l'un des meilleurs de la collection. Le sujet est couvert en 15 chapitres où l'on trouve, à la fois, les notions classiques sur l'hydrolyse, la structure, la chimie des acides nucléiques, les méthodes récentes de détection et d'analyse comme l'absorption des rayons ultra-violets ou les recherches histochimiques, les notions de physiologie moderne concernant le métabolisme des acides nucléiques et leur rôle dans la biosynthèse, enfin des considérations sur l'importance biologique des acides nucléiques en bactériologie et en virologie où réside une grande partie de l'intérêt du sujet. Une liste de références classées par chapitre complète ce travail extrêmement bien documenté et qui constitue sur l'ensemble du sujet une excellente mise au point.

P. L.

Le Gérant : G. MASSON.